

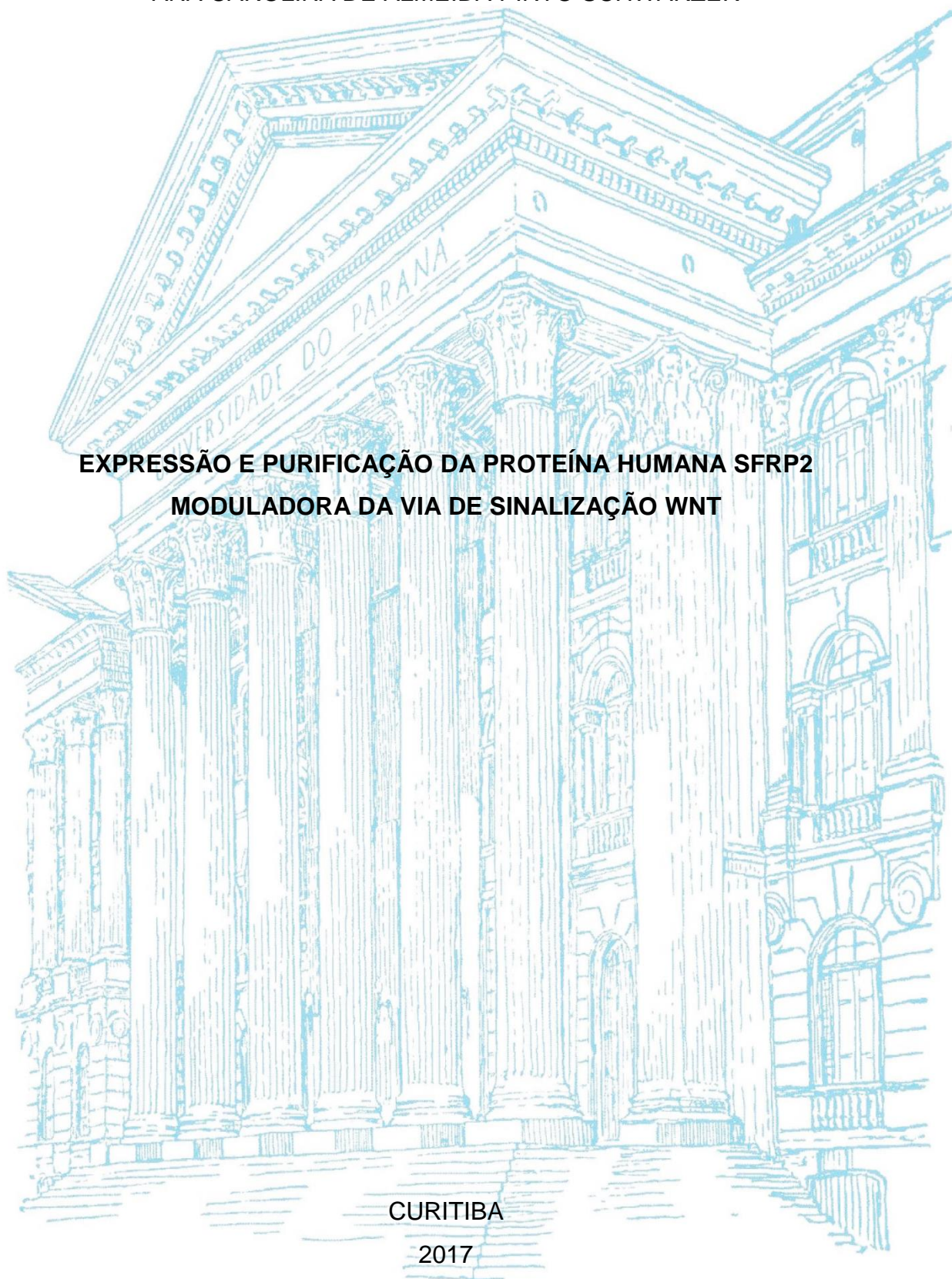
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA CAROLINA DE ALMEIDA PINTO SCHWARZER

**EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA HUMANA SFRP2
MODULADORA DA VIA DE SINALIZAÇÃO WNT**

CURITIBA

2017



ANA CAROLINA DE ALMEIDA PINTO SCHWARZER

**EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA HUMANA SFRP2
MODULADORA DA VIA DE SINALIZAÇÃO WNT**

Monografia apresentada como requisito à obtenção do título de Bacharel, Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Larissa Alvarenga Magalhães

Co-orientadora: Dr^a Flavia Raquel Gonçalves Carneiro

CURITIBA

2017

AGRADECIMENTOS

A Deus, por Seu amor infinito e por sempre me dar forças para superar todas as dificuldades e chegar onde hoje estou.

À minha família e amigos, por me apoiarem em minhas escolhas e acreditarem na minha capacidade de alcançar meus objetivos. Agradeço de forma especial à minha mãe, por todo o carinho e por nunca medir esforços para me ver bem, e ao meu pai, que, mesmo longe, está sempre presente me incentivando a correr atrás dos meus sonhos. Meu amor por vocês é inestimável!

À minha orientadora Flávia Carneiro, pela qual tenho profunda admiração pessoal e profissional. Obrigada pela paciência e dedicação em me orientar, por todos os auxílios e ensinamentos e por acompanhar de perto grande parte da minha jornada ao longo destes cinco anos de graduação. Agradeço imensamente por todo conhecimento e experiência transmitidos, fundamentais não apenas para a conclusão deste projeto, mas também para meu crescimento pessoal e profissional.

A todos os colegas do Laboratório de Proteômica e Engenharia de Proteínas, pela enriquecedora troca de experiências e por tornarem o ambiente de laboratório agradável e descontraído durante os períodos de intenso trabalho. Obrigada pelo companheirismo e amizade e por me ajudarem a estar sempre “desperta e disposta”!

Aos pesquisadores Nilson Zanchin, Beatriz Guimarães, Tatiana Brasil e Larissa Magalhães, pelo incentivo e por todo conhecimento transmitido durante minha caminhada profissional.

A todos os profissionais do Instituto Carlos Chagas e da Universidade Federal do Paraná e a todas as demais pessoas que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse possível.

RESUMO

Wnt consiste em uma ampla família de glicoproteínas sinalizadoras secretadas que controlam diversos processos biológicos como proliferação celular, organogênese, polaridade, migração, diferenciação, senescência e morte celular. Dentre as inúmeras patologias resultantes da desregulação das vias Wnt destacam-se diversos tipos de câncer, incluindo as leucemias. A ativação e repressão da sinalização Wnt são determinadas pelas interações destas proteínas com diferentes receptores de membrana e moduladores secretados, a exemplo de SFRP2. Devido ao papel controverso desta proteína na supressão e progressão de tumores, faz-se fundamental investigar sua atuação em contextos celulares específicos, como linhagens celulares de origem leucêmica, visando sua possível utilização para fins terapêuticos. Este projeto teve como objetivo desenvolver sistemas de expressão para a proteína SFRP2 em linhagens celulares de mamíferos visando sua purificação e posterior caracterização funcional. Para tanto, o cDNA de SFRP2 contendo uma cauda de histidinas na extremidade C-terminal foi subclonado nos vetores de expressão pIRES2-EGFP (Clontech) e pcDNA™3.1 (Invitrogen®) modificado em nosso laboratório, contendo um cassete adicional para expressão de EGFP. As linhagens celulares de mamíferos MDCK, CHO-K1 e HEK293T foram transfectadas por lipossomo ou por eletroporação com ambos os vetores para testar a expressão de SFRP2 e analisadas por microscopia de fluorescência quanto à expressão de EGFP, utilizada como gene marcador, e por *SDS-PAGE* e *Western blot* para a detecção de SFRP2. Células MDCK transfectadas foram selecionadas com antibiótico G418 para obtenção de linhagens estáveis para expressão da proteína recombinante. Apesar de SFRP2 ter sido expressa de forma transiente na linhagem MDCK, a proteína não foi detectada no sobrenadante das culturas celulares selecionadas com G418. A expressão de SFRP2 recombinante foi obtida com sucesso nas linhagens CHO-K1 e HEK293T. A linhagem HEK293T foi escolhida para a produção da proteína recombinante devido à obtenção de maiores quantidades de SFRP2. A expressão da proteína foi realizada em meio de cultura Opti-MEM suplementado com 2,5% SFB para reduzir a quantidade de proteínas no sobrenadante das culturas e facilitar a purificação de SFRP2. Purificações desta proteína foram realizadas por cromatografia de afinidade utilizando a coluna HiTrap Heparin HP (GE Healthcare) e a resina *Ni-NTA Superflow* (QIAGEN®) e as amostras purificadas foram analisadas por *SDS-PAGE*. A proteína recombinante foi obtida com sucesso com alto grau de pureza após as etapas de purificação, possibilitando sua utilização em futuros ensaios funcionais para avaliar a ativação ou inibição da via Wnt e a proliferação e viabilidade celular em linhagens de células leucêmicas.

Palavras-chave: Sinalização Wnt, SFRP2, sistemas de expressão.

ABSTRACT

Wnt proteins comprise a large family of secreted signaling glycoproteins that regulate many biological processes such as proliferation, organogenesis, cell polarity, migration, differentiation, senescence and death. Dysregulation of Wnt pathway has been implicated in many types of cancer, including different types of leukemia. Activation and repression of Wnt signaling pathways are determined by interactions between these proteins and different membrane receptors and secreted modulators, such as SFRP2. Due to the controversial role of this protein on tumor promotion or suppression, it is important to investigate its action in specific cellular contexts, such as in leukemia cell lineages, allowing its use for therapeutic purposes. The aim of this project is to develop mammalian expression systems to produce SFRP2 in order to obtain purified protein for functional studies. The cDNA encoding human SFRP2 containing a C-terminus His-tag was subcloned into the pIRES2-EGFP vector (Clontech) and a modified version of the pcDNATM3.1 vector (Invitrogen®), containing an additional expression cassette for EGFP protein. MDCK, CHO-K1 and HEK293T cell lineages were transfected by liposome or electroporation with both vectors. Cells were analyzed by fluorescence microscopy to visualize EGFP expression, used as reference for transfection efficiency, and by SDS-PAGE and Western blot to detected SFRP2. Transfected MDCK cells were selected using G418 in order to obtain stable cell lines expressing the recombinant protein. Although SFRP2 was transiently expressed in MDCK cells, the protein was not detected on cell culture supernatants after selection with G418. SFRP2 expression was successfully obtained in CHO-K1 and HEK293T cell lines after transient transfection. HEK293T cells were selected to produce the recombinant protein due to the higher levels of SFRP2 expression in Opti-MEM medium supplemented with 2,5% FBS in order to reduce the amount of serum proteins in the supernatant and facilitate SFRP2 purification. Purifications were performed by affinity chromatography using HiTrap Heparin HP column (GE Healthcare) and Ni-NTA Superflow resin (QIAGEN®). The purified samples were analyzed by SDS-PAGE. High purity levels of recombinant SFRP2 protein were successfully obtained, allowing its use for future functional studies to evaluate activation or inhibition of Wnt pathways and cell proliferation and viability in leukemia cell lineages.

Keywords: Wnt pathways, SFRP2, expression systems.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: VIAS DE SINALIZAÇÃO WNT	12
FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA SFRP	13
FIGURA 3: MECANISMOS DE ATUAÇÃO DAS PROTEÍNAS SFRP NA MODULAÇÃO DAS VIAS WNT	14
FIGURA 4: VETORES E INSERTOS PURIFICADOS APÓS DIGESTÃO.....	28
FIGURA 5: ESQUEMA DOS VETORES UTILIZADOS PARA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA SFRP2.....	29
FIGURA 6: DIGESTÕES DE CONFERÊNCIA DOS CLONES.....	30
FIGURA 7: TESTES DE TRANSFEÇÃO POR LIPOSSOMO E EXPRESSÃO DE SFRP2 EM PEQUENA ESCALA.....	33
FIGURA 8: TESTES DE TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS MDCK POR ELETROPORAÇÃO E EXPRESSÃO DE SFRP2 EM MAIOR ESCALA	35
FIGURA 9: TESTES PARA REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SORO NO MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS CHO-K1.....	38
FIGURA 10: EXPRESSÃO DE SFRP2 EM MAIOR ESCALA NA LINHAGEM CHO-K1.....	39
FIGURA 11: TESTE PARA REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SORO NO MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS HEK293T.....	41
FIGURA 12: ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO DE SFRP2 EM COLUNA DE HEPARINA	42
FIGURA 13: ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO DE SFRP2 COM RESINA DE NÍQUEL	43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR .	19
TABELA 2: PROTOCOLO UTILIZADO PARA AMPLIFICAÇÃO DOS INSERTOS DE SFRP2 E EGFP.	19

TABELA 3: CONDIÇÕES DE CICLAGEM UTILIZADAS PARA AS AMPLIFICAÇÕES DE SFRP2 E EGFP.....	19
TABELA 4: PROTOCOLO UTILIZADO PARA AS REAÇÕES DE LIGAÇÃO NOS VETORES pcDNA E pIRES2-EGFP.....	21
TABELA 5: VETORES CONSTRUÍDOS.....	29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo Geral	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. Subclonagem do cDNA de SFRP2 nos vetores de expressão pcDNA TM 3.1 modificado e pIRES2-EGFP	17
3.1.1. Amplificação dos insertos e digestão dos insertos e vetores	18
3.1.2. Construção dos vetores	20
3.1.2.1. Construção dos vetores pcDNA-SFRP2, pcDNA-EGFP e pcDNA-SFRP2-EGFP	20
3.1.2.2. Clone pIRES2-EGFP-SFRP2	20
3.1.2.3. Reações de ligação	21
3.1.2.4. Transformações e extração do DNA plasmideal	21
3.1.2.5. Conferência das clonagens	22
3.2. Cultivo celular	22
3.2.1. Transfecções das linhagens celulares	22
3.2.2. Testes para redução da quantidade de SFB no meio de cultura	24
3.3. Testes de interação da proteína SFRP2 com as resinas <i>Ni-NTA Superflow</i> e <i>Heparin Sepharose 6 FF</i>	24
3.4. Purificação da proteína SFRP2 recombinante	25
3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida e ensaios de <i>Western blot</i>	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1. Construção dos vetores	27
4.2. Expressão de SFRP2 em linhagens celulares de mamíferos	30
4.2.1. Testes de expressão de SFRP2 recombinante	30

4.2.2. Aumento da escala de expressão de SFRP2 recombinante	33
4.2.2.1. Expressão em células MDCK.....	33
4.2.2.2. Expressão em células CHO-K1 e testes para redução do soro no meio de cultura.....	37
4.2.2.3. Expressão em células HEK293T e testes para redução do soro no meio de cultura.....	39
4.3. Purificação de SFRP2 recombinante	41
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

Wnt compreende uma ampla família de glicoproteínas sinalizadoras secretadas ricas em cisteínas e que exercem papel fundamental no desenvolvimento embrionário e na homeostase de tecidos adultos em diversos organismos (WILLERT & NUSSE, 2012; CRUCIAT & NIEHRS, 2013). Ao menos 19 membros da família Wnt são encontrados em humanos, exibindo padrões de expressão únicos e funções distintas ao longo do desenvolvimento (KIKUCHI *et al.*, 2011). Estas proteínas controlam diversas funções celulares e estão envolvidas em processos como diferenciação celular, organogênese, especificação dos eixos corporais, proliferação, migração, senescência e morte celular, além da renovação de células-tronco (KOMIYA & HABAS, 2008; NIEHRS, 2012; WILLERT & NUSSE, 2012; CRUCIAT & NIEHRS, 2013).

Três vias de sinalização – canônica, não-canônica PCP e não-canônica Wnt/Ca⁺² – podem ser desencadeadas pela interação entre estas glicoproteínas e o receptor de membrana *Frizzled* (Fz), em conjunto com diferentes co-receptores. A via canônica Wnt/ β -catenina é a mais bem caracterizada até o momento e sua principal característica consiste no acúmulo e translocação de β -catenina para o núcleo da célula (**Figura 1A**). Na ausência da sinalização Wnt, a β -catenina citoplasmática permanece sob ação de um complexo de destruição formado pelas proteínas Axina, APC (*Adenomatosis Polyposis Coli*), PP2A (*Protein Phosphatase 2A*), GSK3- β (*Glycogen Synthase Kinase 3- β*) e CK1 α (*Casein Kinase 1 α*). Após fosforilação por GSK3- β e CK1 α , a β -catenina é ubiquitinada e subsequentemente degradada pela maquinaria proteossomal. Com a redução dos níveis de β -catenina, o fator de transcrição TCF/LEF (*T-cell factor/lymphoid enhancer factor*) permanece ligado ao repressor Groucho, o qual recruta histonas desacetilases que atuam de modo a reprimir a transcrição dos genes-alvo (KIKUCHI *et al.*, 2011). Alternativamente, a interação entre proteínas Wnt, receptores Fz e co-receptores LRP5/6 (*Low-density-lipoprotein-Related Protein 5/6*) ocasiona a atração de Axina ao domínio citoplasmático de LRP5/6 e a consequente ativação da proteína Dsh (*Dishvelled*), a qual inibe a atividade de GSK3- β . Neste contexto, o complexo de destruição é desfeito, o que resulta na estabilização e acúmulo de β -catenina no citoplasma, bem como sua translocação para o núcleo e

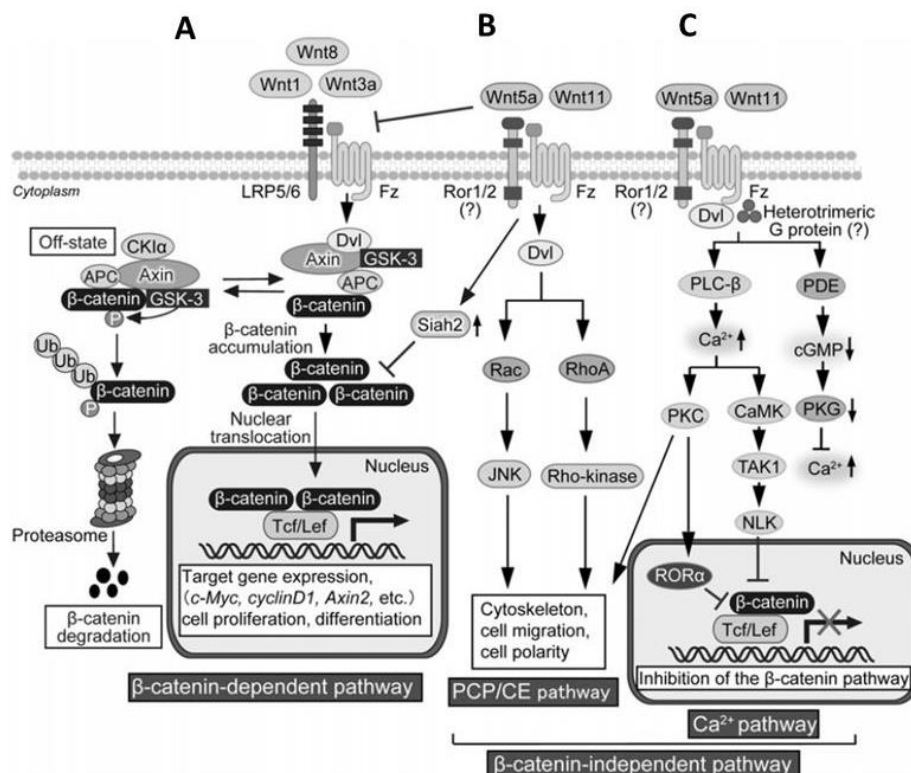
consequente associação com o fator de transcrição TCF/LEF, levando à ativação de genes-alvo como *TCF-1*, *c-myc* e *CCND1* (ciclina D1) (KOMIYA & HABAS, 2008; KIKUCHI *et al.*, 2011).

As vias não-canônicas independem da atuação da β -catenina e utilizam outros co-receptores e componentes da maquinaria intracelular para a transdução de sinal (NIEHRS, 2012). A sinalização PCP (*Planar Cell Polarity*) é mediada por co-receptores ROR1/2 (*Receptor Tyr kinase-like orphan receptor*) ou PTK7 (*Protein Tyr kinase 7*) que, em conjunto com receptores Fz e proteínas Wnt, ativam pequenas GTPases Rho e Rac que estimulam a atividade de proteínas quinase como JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), induzindo rearranjos do citoesqueleto e modificações na polaridade das células em diversos processos morfogenéticos (KIKUCHI *et al.*, 2011; NIEHRS, 2012) (**Figura 1B**). A ativação desta via também pode interferir na atividade da β -catenina de modo a antagonizar a sinalização canônica (NIEHRS, 2012). Já na via Wnt/ Ca^{+2} a ativação de receptores Fz e co-receptores ROR e RYK (*Receptor Tyr kinase*) resulta na liberação de cálcio dos estoques intracelulares e consequente ativação de efetores como CAMKII (*Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*), PKC (*protein kinase C*) e calcineurina, as quais modulam a atividade do fator de transcrição NFAT (*Nuclear Factor of Activated T-cells*) (KIKUCHI *et al.*, 2011; NIEHRS, 2012) (**Figura 1C**). Embora alguns autores diferenciem certas proteínas Wnt como canônicas e não-canônicas quanto sua atuação nas diferentes vias de sinalização, estudos demonstram que a ativação e repressão destas vias parece ser mais determinada pelo contexto celular – como o repertório de receptores de membrana, transdutores de sinal e parceiros solúveis – do que por propriedades intrínsecas destas glicoproteínas (WILLERT & NUSSE, 2012).

A regulação da sinalização Wnt é complexa e pode ocorrer em diferentes níveis, através da modulação das interações ligante-receptor ou da atividade dos componentes da maquinaria de transdução de sinal (CRUCIAT & NIEHRS, 2013). Como anteriormente mencionado, diferentes vias Wnt podem ser desencadeadas conforme a combinação específica de ligantes Wnt e seus receptores de membrana, como Fz, LRP5/6, ROR, PTK7, RYK e MUSK (*Muscle Skeletal receptor Tyr kinase*) (KIKUCHI *et al.*, 2011; NIEHRS, 2012). Outros processos como fosforilação de receptores, endocitose dos complexos

Wnt/receptor, geração de fosfolípidos, acidificação intra e extracelular e a ligação de proteínas Wnt a proteoglicanos de heparan sulfato também estão envolvidos na ativação seletiva destas vias (KIKUCHI *et al.*, 2011; NIEHRS, 2012). Além disso, uma ampla variedade de moduladores secretados podem atuar como ativadores ou inibidores destas vias de sinalização. As famílias Norrin e R-spondin constituem os principais agonistas capazes de potencializar a sinalização Wnt (CRUCIAT & NIEHRS, 2013). Dentre os principais antagonistas, encontram-se as famílias DKK (*Dickkopf*), SFRP (*Secreted Frizzled-related Proteins*), WIF-1 (*Wnt Inhibitory Factor 1*), Wise/SOST, Cerberus e IGFBP-4 (*Insulin-like Growth-factor Binding Protein*), bem como as proteínas transmembrânicas Shisa, Waif1/5T4 (*Wnt-activated Inhibitory Factor 1*), APCDD1 (*Adenomatosis Polyposis Coli Down-regulated 1*) e Tiki 1. Algumas destas famílias atuam especificamente na via Wnt/ β -catenina, enquanto outras são menos seletivas e podem interferir tanto na sinalização canônica quanto não-canônica (CRUCIAT & NIEHRS, 2013).

FIGURA 1: VIAS DE SINALIZAÇÃO WNT. A: Via canônica, dependente de β -catenina. B: Via não-canônica PCP (*Planar Cell Polarity*). C: Via não-canônica Wnt/ Ca^{2+} .



FONTE: KIKUCHI *et al.*, 2011.

As proteínas SFRP constituem a maior família de proteínas secretadas capazes de modular a sinalização Wnt, sendo encontrados 5 membros em humanos e outros mamíferos (SFRP1-5) (CRUCIAT & NIEHRS, 2013). Com tamanho variável entre 245 e 346 aminoácidos, estas proteínas compartilham um CRD (*cysteine-rich domain*) amino-terminal composto por 10 resíduos de cisteína altamente conservados que interagem entre si por pontes dissulfeto e cuja sequência apresenta-se de 30% a 50% similar ao CRD dos receptores Fz (REHN *et al.* 1998; CHONG *et al.* 2002). Na extremidade C-terminal encontra-se um motivo NTR (*Netrin-related motif*) caracterizado pela presença de resíduos de aminoácidos positivamente carregados, os quais conferem propriedades de ligação à heparina (UREN *et al.* 2000), bem como de seis resíduos de cisteína que formam três pontes dissulfeto (CHONG *et al.* 2002) (Figura 2).

FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA SFRP. Proteínas SFRPs são caracterizadas pela presença de um domínio amino-terminal rico em cisteínas (CRD, *cysteine-rich domain*), bem como de um motivo NTR (*Netrin-related motif*) situado na extremidade C-terminal, responsável por conferir propriedades de ligação à heparina.

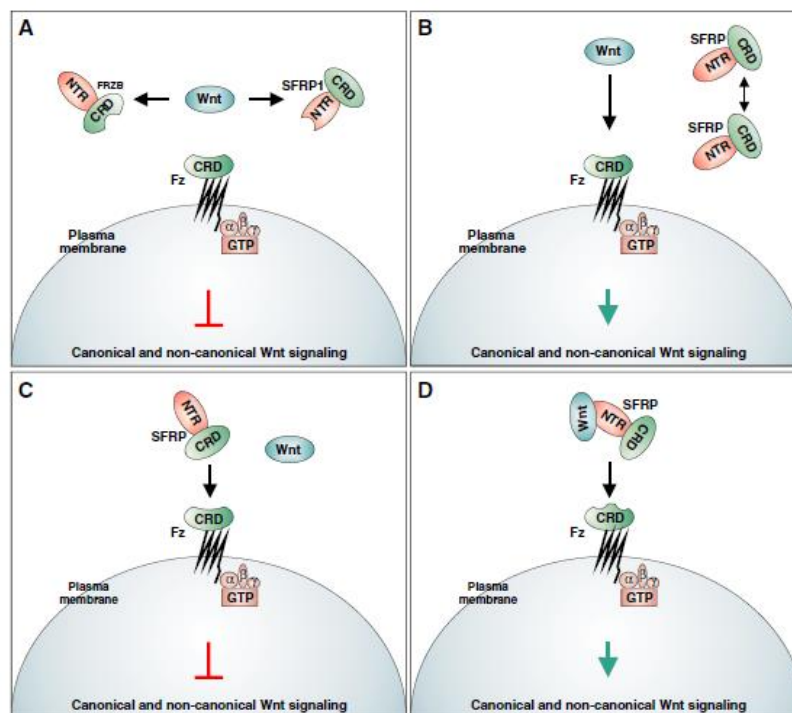


FONTE: CRUCIAT & NIEHRS, 2013.

SFRPs atuam predominantemente como antagonistas da transdução de sinal Wnt, modulando tanto a via canônica (dependente de β -catenina) quanto a via não-canônica PCP (LI *et al.* 2008b; SATOH *et al.* 2008; SUGIYAMA *et al.* 2010; CRUCIAT & NIEHRS, 2013). O mecanismo inibitório destes efetores baseia-se no bloqueio da interação entre Wnt e Fz, o qual pode ocorrer tanto pelo sequestro de Wnts presentes no meio extracelular (WANG *et al.* 1997; BOVOLENTA *et al.*, 2008), quanto pela formação de complexos heterodiméricos não-funcionais entre os CRDs das SFRPs e dos receptores Fz (BOVOLENTA *et al.*, 2008) (Figuras 3A e 3C). Alternativamente, estes moduladores são capazes de atuar como agonistas destas vias ao formarem complexos homodiméricos via domínio CRD, desta forma possibilitando o acesso de Wnt ao receptor de membrana, além de favorecerem a ligação Wnt-

Fz ao interagirem simultaneamente com ambas as moléculas-alvo por diferentes domínios (BOVOLENTA *et al.*, 2008) (**Figura 3B e 3D**). Embora o domínio CRD seja fundamental para a atividade modulatória, estudos demonstram que outras regiões das SFRPs podem exercer papel importante na interação destas proteínas com Wnts, sugerindo a possibilidade de associações com diferentes afinidades e/ou a presença de diferentes sítios de ligação entre estas moléculas (CRUCIAT & NIEHRS, 2013).

FIGURA 3: MECANISMOS DE ATUAÇÃO DAS PROTEÍNAS SFRP NA MODULAÇÃO DAS VIAS WNT. As proteínas SFRPs são capazes de ativar a sinalização por meio da interação com Wnts via CRD ou NTR (A) ou pela formação de complexos heterodiméricos não-funcionais com o CRD dos receptores Fz (C). Alternativamente, estes moduladores podem atuar como antagonistas das vias ao formarem homodímeros, tornando os receptores acessíveis às Wnts (B) ou ao interagirem simultaneamente com ambas as proteínas, favorecendo a formação do complexo Wnt-Fz (D).



FONTE: BOVOLENTA *et al.*, 2008.

Apesar dos mecanismos regulatórios sofisticados e complexos, a sinalização Wnt encontra-se desregulada em inúmeras patologias, como doenças neurológicas, autoimunes e em diversos tipos de câncer (NIEHRS, 2006; ZIMMERMAN, MOON & CHIEN, 2012; CRUCIAT & NIEHRS, 2013). A ativação constitutiva da via Wnt canônica em especial tem sido bem documentada em diversas neoplasias (RUBIN *et al.*, 2006). Mutações que

impedem a fosforilação e degradação de β -catenina estão frequentemente associadas ao desenvolvimento de tumores colorretais (WHITE, CHIEN & DAWSON, 2008), carcinoma hepatocelular (KITISIN *et al.*, 2007) e meduloblastoma (ZURAWEL *et al.*, 1998). A elevação da atividade repórter de Wnt/ β -catenina e dos níveis de β -catenina nuclear também foi observada em progenitores mieloides isolados de pacientes com CML (*Chronic Myeloid Leukemia*) (JAMIESON *et al.*, 2004), bem como em diversos casos de T-ALL (*T-cell acute lymphoblastic leukemia*) (NG *et al.*, 2014). Outro importante papel das vias Wnt neste contexto consiste na manutenção de CSCs (*Cancer Stem Cells*), populações de células cancerígenas com alto potencial metastático (NGUYEN *et al.*, 2012). Vermeulen *et al.* (2010) demonstraram que células de câncer de cólon inicialmente incapazes de desenvolver tumores devido à baixa atividade de Wnt adquiriram propriedades tumorigênicas quando cultivadas na presença de fatores capazes de potencializar a transdução de sinal. O aumento dos níveis e a ativação da β -catenina também foram observados em subpopulações de células-tronco capazes de desenvolver tumores de latência curta em camundongos (YEUNG *et al.*, 2010).

Alterações na expressão dos moduladores secretados também podem interferir na sinalização Wnt, contribuindo para a progressão ou supressão de tumores (RUBIN *et al.*, 2006). Padrões epigenéticos diferenciados têm sido detectados para diversos antagonistas destas vias, especialmente para membros da família SFRP, em vários tipos de câncer, incluindo meduloblastoma (KONGKHAM *et al.*, 2010), carcinoma hepatocelular (HCC, *Hepatocellular Carcinoma*) (CHENG *et al.*, 2011), câncer gástrico (CHENG *et al.*, 2007), pancreático (VINCENT *et al.*, 2011) e de cólon (SAMAEI *et al.*, 2014), câncer de mama (XIANG *et al.*, 2013), câncer oral e de orofaringe (OSCC, *Oral Squamous Cell Carcinoma*) (XIAO *et al.*, 2014; PALUSZCZAK *et al.*, 2015) e diferentes tipos de leucemias, como ALL (*Acute Lymphoblastic Leukemia*) (ROMAN-GOMEZ *et al.*, 2004), AML (*Acute Myeloid Leukemia*) (VALENCIA *et al.*, 2009; GIFFITHS *et al.*, 2010; CHENG *et al.*, 2011; GHASEMI *et al.*, 2015) e CLL (*Chronic Lymphocytic Leukemia*) (MOSKALEV *et al.*, 2012), bem como na síndrome mielodisplásica (WANG *et al.*, 2013).

A hipermetilação do promotor de SFRP2 em particular foi observada em 73% dos tecidos primários de câncer gástrico (CHENG *et al.*, 2007), 83%

dos carcinomas primários de mama (VEECK *et al.*, 2008), 82% dos tumores de adenocarcinomas cervicais (LIN *et al.*, 2009) e 70% dos tumores de próstata (PERRY *et al.*, 2013), bem como em diversas linhagens de HCC (CARRUBA *et al.*, 1999), câncer colorretal (QI *et al.*, 2006), câncer de mama (VEECK *et al.*, 2008) e glioblastoma (GÖTZE *et al.*, 2010). Alterações epigenéticas também foram correlacionadas à redução dos níveis de expressão de SFRP2 em tumores de melanoma maligno (LUO *et al.*, 2016) e câncer de bexiga (URAKAMI *et al.*, 2006), bem como à superativação da via Wnt/ β -catenina em células com fenótipo tumorigênico OSCC (ESTEVE & BOVOLENTA, 2010; SURANA *et al.*, 2014; XIAO *et al.*, 2014), corroborando com a função supressora tumoral inicialmente atribuída a estes moduladores. Estudos demonstraram ainda que a restauração da expressão de SFRP2 ocasionou um decréscimo na proliferação celular, transformação e invasão em linhagens celulares de câncer cervical (CHUNG *et al.*, 2009), além de contribuir para redução da atividade proliferativa, indução da apoptose e supressão tumoral em linhagens celulares de câncer gástrico após tratamento com agentes desmetilantes (SURANA *et al.*, 2014).

Entretanto, SFRP2 apresenta um papel controverso na promoção e progressão de tumores, uma vez que a inibição destes moduladores é capaz de impedir o desenvolvimento de angiossarcoma, além de reduzir à metade o volume de tumores de câncer de mama em comparação ao controle (FONTENOT *et al.*, 2013). Sua atuação como oncogene também foi verificada em carcinoma renal, na medida em que a expressão estável desta proteína ocasionou o aumento da proliferação celular *in vitro* e o crescimento de tumores *in vivo* (YAMAMURA *et al.*, 2010). Ademais, em linhagens de câncer de pulmão os fenótipos de proliferação, migração e invasão das células cancerosas correlacionaram-se positivamente com os níveis de expressão de SFRP2, sugerindo uma possível atuação desta proteína como promotora deste tipo de neoplasia (XIAO *et al.*, 2015).

Sendo assim, embora o uso de SFRP2 como terapia para o câncer tenha sido sugerido nos últimos anos (VEECK & DAHL, 2012; ANASTAS & MOON, 2012; BLAGODATSKI *et al.*, 2014), faz-se necessário investigar o papel desta proteína em contextos celulares específicos, como sua função em linhagens celulares de origem leucêmica. Até o momento sabe-se que em

cerca de 15 a 30% dos pacientes com leucemia o promotor de SFRP2 encontra-se hipermetilado (VALENCIA *et al.*, 2009; GRIFFITHS *et al.*, 2010; GHASEMI *et al.*, 2015). Isso indica que uma parcela significativa de pacientes poderia ser beneficiada caso essa proteína atue como supressora tumoral em células leucêmicas. Dessa forma, este projeto tem como objetivo a expressão e purificação da proteína SFRP2 para futuros ensaios funcionais quanto à ativação ou inibição da via Wnt canônica e quanto ao seu papel sobre a viabilidade e proliferação celular em linhagens de células leucêmicas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver um sistema de expressão para a proteína SFRP2 em linhagens celulares de mamíferos, visando à obtenção da proteína ativa para posterior caracterização funcional.

2.2. Objetivos específicos

- Subclonar o cDNA da proteína humana SFRP2 nos vetores de expressão pcDNA™3.1 modificado (SANTOS, 2016) e pIRES2-EGFP (Clontech).
- Transfectar as linhagens celulares de mamíferos com os clones construídos.
- Confirmar por *SDS-PAGE* e *Western blot* a expressão da proteína de interesse no sobrenadante das culturas celulares.
- Obter linhagens celulares estáveis para a expressão de SFRP2, através da seleção com antibiótico ou por citometria de fluxo com base nos níveis de fluorescência de EGFP.
- Estabelecer um protocolo para a purificação de SFRP2.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Subclonagem do cDNA de SFRP2 nos vetores de expressão pcDNA™3.1 modificado e pIRES2-EGFP

3.1.1. Amplificação dos insertos e digestão dos insertos e vetores

O cDNA da proteína humana SFRP2 foi adquirido comercialmente no vetor pF1K T7 Flexi® Vector (Promega Corp, Madison, Wisconsin, EUA) e amplificado pelo método de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A sequência codificadora completa da proteína foi amplificada contendo o peptídeo-sinal nativo da SFRP2 e uma sequência de seis histidinas na extremidade C-terminal da proteína para facilitar a purificação por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC, *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*). A amplificação da sequência nucleotídica da proteína EGFP a partir do vetor pIRES2-EGFP (Clontech) para inserção no vetor pcDNA™3.1 (Invitrogen™) modificado também foi realizada.

Os oligonucleotídeos específicos para amplificação de EGFP foram desenhados a partir da sequência do vetor comercial pIRES2-EGFP, enquanto os oligonucleotídeos específicos para a proteína SFRP2 foram desenhados a partir das sequências disponíveis na base de dados NCBI (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>). Os sítios das respectivas enzimas de restrição a serem utilizadas nas posteriores etapas de subclonagem foram inseridos em todos os oligonucleotídeos (**Tabela 1**). Todas as reações de PCR foram realizadas conforme o protocolo descrito na **Tabela 2**, utilizando 10 ng dos respectivos vetores como molde e os oligonucleotídeos específicos para cada inserto de interesse. As condições de amplificação utilizadas encontram-se descritas na **Tabela 3**.

Os insertos de SFRP2 e EGFP amplificados foram purificados utilizando o kit QIAquick PCR Purification Kit Protocol (QIAGEN®) e digeridos com as respectivas enzimas de restrição, visando à criação de extremidades coesivas para posterior subclonagem nos vetores de expressão. Cerca de 5 µg dos vetores pIRES2-EGFP (Clontech) e pcDNA™3.1 (Invitrogen™) modificado foram digeridos com os pares de enzimas *XhoI* e *EcoRI* (New England BioLabs®) e *NotI* e *HindIII* (New England BioLabs®), respectivamente, visando à linearização para posterior subclonagem dos insertos. Todas as digestões foram realizadas a 37°C *overnight*, utilizando 2 U enzima/1 µg de DNA e tampões compatíveis com as respectivas enzimas de restrição. Insertos e vetores digeridos foram posteriormente purificados utilizando os kits QIAquick

PCR Purification Kit Protocol (QIAGEN®) e QIAquick® Gel Extraction (QIAGEN®), respectivamente, de acordo com as recomendações do fabricante, e analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

TABELA 1: OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR. Os oligonucleotídeos designados como F (do inglês *forward*) hibridam na fita 3'-5' e os designados como R (do inglês *reverse*) hibridam na fita 5'-3'. Em negrito estão destacados os sítios para as enzimas de restrição. Tm: *melting temperature*.

Inserto	Nome do oligonucleotídeo	Sítio da enzima de restrição	Sequência 5'-3'	Tm (°C)
SFRP2	SFRP2_F_xho	<i>Xho</i> I	GATC CTCGAG ATGCTGCAGGGCCCTGGCTCGC	71,7
	SFRP2_His_R_Eco	<i>Eco</i> RI	CATAG AATTCT CAGTGATGGTGGTGATGGTGAC TTCTCCGCACTGCAGCTTGCGGATGCTG	71,6
	SFRP2_F	<i>Hind</i> III	GATC AAGCTT ATGCTGCAGGGCCCTGGCTCGC	69,6
	SFRP2_His_R	<i>Not</i> I	CATAG GCGGCCG CTCAGTGATGGTGGTGATGGT GACTTCCTCCGCACTGCAGCTTGCGGATGCTG	74,6
EGFP	EGFP_F	<i>Hind</i> III	GACT AAGCTT CCACAACCATGGTGAGCAAGGG	64,9
	EGFP_R	<i>Not</i> I	CTGAG GCGGCCG CTTTACTTGTACAGCTCG	65,6

TABELA 2: PROTOCOLO UTILIZADO PARA AMPLIFICAÇÃO DOS INSERTOS DE SFRP2 E EGFP.

Protocolo *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen)
(Adaptado)

Componente	Concentração
<i>High Fidelity PCR Buffer</i>	1 X
Desoxinucleotídeos (dNTPs)	0,6 mM
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄)	2 mM
Oligonucleotídeo Iniciador <i>forward</i>	0,2 µM
Oligonucleotídeo Iniciador <i>reverse</i>	0,2 µM
Ácido desoxirribonucleico (<i>template</i>)	10 ng
<i>Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity</i>	1 U

TABELA 3: CONDIÇÕES DE CICLAGEM UTILIZADAS PARA AS AMPLIFICAÇÕES DE SFRP2 E EGFP

Etapa	Temperatura	Duração
Desnaturação inicial	94 °C	5 min
Desnaturação	94 °C	30 s
Hibridação	57 °C	30 s
Extensão	68 °C	1 min
Extensão final	68 °C	10 min

3.1.2. Construção dos vetores

3.1.2.1. Construção dos vetores pcDNA-SFRP2, pcDNA-EGFP e pcDNA-SFRP2-EGFP

Duas versões do vetor pcDNA™3.1 (Invitrogen®) foram modificadas em nosso laboratório pela aluna de mestrado Nayara Santos (SANTOS, 2016), visando à criação de sítios de restrição que possibilitassem a subclonagem simultânea de dois cassetes de expressão distintos. As duas versões diferiam quanto ao gene de resistência a antibiótico (higromicina ou neomicina), possibilitando a utilização destes antibióticos para posterior seleção de células com altos níveis de expressão do transgene de interesse. Ambas as versões deste vetor foram utilizadas para a subclonagem do cDNA da proteína SFRP2 em conjunto com a proteína EGFP – cada qual em um cassete de expressão sob o controle do promotor CMV –, possibilitando a transcrição e tradução de cada proteína de maneira independente.

Inicialmente, os insertos das proteínas SFRP2 e EGFP preparados conforme descrito no item 3.1.1. foram digeridos com as enzimas *HindIII* e *NotI* (New England BioLabs®) e subclonados individualmente em ambas as versões do vetor pcDNA™3.1 modificado previamente digerido com as mesmas enzimas, de modo a criar os clones pcDNA(HYGRO)-SFRP2, pcDNA(NEO)-SFRP2, pcDNA(HYGRO)-EGFP e pcDNA(NEO)-EGFP. Em seguida, o cassete de expressão de EGFP foi obtido a partir da digestão do vetor pcDNA(NEO)-EGFP com as enzimas *XbaI* e *BglII* (New England BioLabs®) e transferido para o vetor pcDNA(NEO)-SFRP2 previamente digerido com *BglII* e *SpeI*-HF® (New England BioLabs®) para a construção do clone pcDNA(NEO)-SFRP2-EGFP. Todas as digestões foram realizadas nas condições descritas no item 3.1.1.

3.1.2.2. Clone pIRES2-EGFP-SFRP2

O cDNA da proteína SFRP2 também foi digerido com as enzimas *XhoI* e *EcoRI* (New England BioLabs®) e subclonado no vetor bicistrônico pIRES2-EGFP (Clontech) previamente digerido com as mesmas enzimas. As digestões foram realizadas conforme descrito no item 3.1.1.

3.1.2.3. Reações de ligação

As ligações de todos os insertos nos vetores pcDNA™3.1 modificados e pIRES2-EGFP foram realizadas conforme o protocolo descrito na **Tabela 4**, utilizando a proporção 6:1 (massa/massa) de inserto/vetor. Todas as amostras foram incubadas a 18°C *overnight* e a enzima T4 DNA Ligase foi posteriormente inativada por aquecimento a 65°C por 10 minutos.

TABELA 4: PROTOCOLO UTILIZADO PARA AS REAÇÕES DE LIGAÇÃO NOS VETORES pcDNA E pIRES2-EGFP.

**DNA Insert Ligation (Sticky-end) into Vector DNA
(Thermo Scientific)**

Reagente	Concentração final
<i>T4 DNA Ligase Buffer</i>	1 X
Vetor linear	20-100 ng
Inserto	100-500 ng
T4 DNA Ligase	0,05 U/μL

3.1.2.4. Transformações e extração do DNA plasmideal

A cepa de *E. coli* DH5α foi transformada por choque térmico com todas as ligações e os clones construídos. Colônias obtidas após a transformação foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 2 mL de meio LB e os respectivos antibióticos (50 μg/mL de ampicilina para pcDNA ou 25 μg/mL de canamicina para pIRES2-EGFP). Os inóculos foram incubados a 37°C com agitação de 200 rpm até o dia seguinte.

O DNA plasmideal foi extraído a partir dos inóculos pelo método de lise alcalina. Os *pellets* obtidos após a centrifugação das culturas líquidas a 14000 g por 5 minutos foram ressuspensos em 300 μL de tampão P1 (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10mM EDTA) contendo 100 μg de RNase A. Após incubação à temperatura ambiente por 5 minutos, 300 μL de tampão P2 (0,2 M NaOH; 1% SDS) foram adicionados em cada amostra. A incubação à temperatura ambiente por 5 minutos foi sucedida pela adição de 300 μL de tampão P3 (3 M KAc pH 5,0-5,5) gelado, seguida de centrifugação a 12000 g por 10 minutos. Cerca de 750 μL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo e uma

nova centrifugação foi realizada a 12000 g por 10 minutos. Ao sobrenadante coletado foram adicionados 400 µL de isopropanol. Após centrifugação a 12000 g por 10 minutos, os *pellets* obtidos foram lavados com 500 µL de etanol 70% gelado e centrifugados a 12000 g por 5 minutos. Em seguida, o etanol foi descartado e os *pellets* resultantes foram ressuspensos em 40 µL de água Milli-Q® após secagem à temperatura ambiente.

3.1.2.5. Conferência das clonagens

Após a extração do DNA plasmideal, alíquotas de DNA dos clones construídos foram digeridas com as respectivas enzimas de restrição a fim de verificar a presença dos insertos nos vetores de interesse. A alíquota do clone pcDNA(NEO)-SFRP2-EGFP foi digerida com as enzimas *Bgl*II e *Hind*III (New England Biolabs®). Todas as digestões foram realizadas utilizando 2 U enzima/1 µg DNA e tampões compatíveis com as enzimas utilizadas. As reações foram incubadas a 37°C por 2 h e analisadas após eletroforese em gel de agarose 0,8%. Todos os clones construídos foram sequenciados e analisados antes da utilização em etapas subsequentes.

3.2. Cultivo celular

As linhagens celulares de mamíferos MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*), CHO-K1 (*Chinese Hamster Ovary*) e HEK293T (*Human Embryonic Kidney*) foram cultivadas em garrafas de 75 cm² em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco®) (MDCK e HEK293T) ou RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*, Gibco®) (CHO-K1) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), a 37°C em incubadora com atmosfera de 5% CO₂.

3.2.1. Transfecções das linhagens celulares

Para testar a expressão da proteína SFRP2, as linhagens celulares MDCK, CHO-K1 e HEK293T foram transfectadas por lipossomo ou por eletroporação (MDCK) com os clones pIRES2-EGFP-SFRP2 ou pcDNA(NEO)-

SFRP2-EGFP. Os respectivos vetores vazios foram também utilizados para as transfecções, servindo como controles negativos.

As transfecções por lipossomo foram realizadas em meio livre de soro (Opti-MEM™ I, Gibco®), utilizando o reagente Lipofectamine® (Invitrogen®) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Transfecções em pequena escala foram realizadas em placas de cultura de seis poços utilizando 2 µg (MDCK e HEK293T) ou 4 µg (CHO-K1) de cada plasmídeo e 5 µL (CHO-K1 e HEK293T) ou 10 µL (MDCK) de Lipofectamine®. Para o aumento da escala de expressão, as células foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm² e transfectadas com 15 µg (HEK293T) ou 20 µg (CHO-K1) de cada vetor e 35 µL (HEK293T) ou 40 µL (CHO-K1) de Lipofectamine®. A adição de SFB ao meio de cultura foi realizada cerca de 5 h após a transfecção.

Para avaliar a eficiência de transfecção da linhagem MDCK por eletroporação, 5x10⁶ células foram eletroporadas com 10, 30 ou 50 µg do vetor pcDNA(NEO)-EGFP. As células foram submetidas a um choque de 240 V e 950 µF em meio Opti-MEM™ I sem soro e em seguida cultivadas em garrafas de 75 cm² em meio DMEM suplementado com 10% SFB. Para a expressão da proteína SFRP2 recombinante em maior escala, as células foram eletroporadas com 30 µg de DNA plasmideal (pIRES2-EGFP-SFRP2 circular ou pcDNA(NEO)-SFRP2-EGFP linearizado com a enzima *PvuI*, Invitrogen®) e selecionadas com antibiótico G418 (400 µg/mL) visando à obtenção de linhagens estáveis contendo altos níveis de expressão de SFRP2. A adição do antibiótico foi realizada no dia seguinte à transfecção.

As células transfectadas foram analisadas por microscopia de fluorescência para o monitoramento dos níveis de fluorescência de EGFP e os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados em diferentes tempos após as transfecções para purificação com a resina *Ni-NTA Superflow* (QIAGEN®). Células MDCK e HEK293T foram lisadas em tampão Ripa (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,25% deoxicolato Na; 1% NP-40) suplementado com inibidores de proteases (10 µg/mL Aprotinina; 10 µg/mL Leupeptina; 2 µg Pepstatina; 2 mM PMSF) 48 h após as transfecções para a obtenção dos extratos. A presença da proteína SFRP2 nos extratos celulares e sobrenadantes purificados foi posteriormente verificada por *SDS-PAGE* e *Western blot*.

3.2.2. Testes para redução da quantidade de SFB no meio de cultura

Para facilitar as etapas posteriores de purificação e obter a proteína SFRP2 em maior grau de pureza, o cultivo das células CHO-K1 e HEK293T transfectadas foi testado em meio Opti-MEM™ I (Gibco®), que permite reduzir a concentração de SFB. Para tanto, as células foram transfectadas por lipossomo com o clone pIRES2-EGFP-SFRP2 e cultivadas em placas de seis poços na presença de 0, 0,5, 2,5, 5 ou 10% SFB. Os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados 72 h após a transfecção e purificados com resina para análise dos níveis de expressão de SFRP2 por *SDS-PAGE* e *Western blot*.

3.3. Testes de interação da proteína SFRP2 com as resinas *Ni-NTA Superflow* e *Heparin Sepharose 6 FF*

A expressão de SFRP2 em pequena escala foi analisada nos sobrenadantes provenientes das culturas de células MDCK, CHO-K1 e HEK293T transfectadas e cultivadas em placas de seis poços. Sobrenadantes de 2 mL foram coletados 24, 48, 72 ou 96 h após a transfecção, centrifugados a 14000 rpm por 5 minutos a 4°C e subsequentemente incubados por 2 h a 4°C com 40 µL de resina *Ni-NTA Superflow* previamente equilibrada em tampão A (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 20 mM imidazol). A etapa de lavagem da resina foi realizada com 1 mL de tampão A e posterior centrifugação a 14000 rpm por 2 minutos a 4°C. Para a eluição, a resina foi incubada com 40 µL de tampão B (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 800 mM imidazol) por 5 minutos a temperatura ambiente. Após uma nova centrifugação a 14000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante contendo a proteína eluída foi transferido para um novo tubo e à resina remanescente foram adicionados 15 µL de tampão B e tampão de amostra para *SDS-PAGE* (240 mM Tris-HCl pH 6,8; 30% glicerol; 6% SDS; 0,04% azul de bromofenol; 5% β-mercaptoetanol) previamente à incubação a 96°C por 5 minutos. As eluições e resinas foram posteriormente analisadas por *SDS-PAGE* e *Western blot* para a identificação de SFRP2.

Os sobrenadantes de 15 mL (correspondentes ao cultivo em uma garrafa de 75 cm²) provenientes das transfecções de células CHO-K1 ou

MDCK foram coletados 72 h ou um mês após a transfecção e seleção com o antibiótico G418, respectivamente, e purificados utilizando a resina *Heparin Sepharose™ 6 Fast Flow* (GE Healthcare Life Sciences) ou *Ni-NTA Superflow*, respectivamente, de acordo com o protocolo anteriormente descrito. Para a purificação com resina de heparina, utilizou-se tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4 (tampão A) contendo 750 mM NaCl (tampão B1) ou 1,5 M NaCl (tampão B2). As amostras foram incubadas com 200 µL de resina de níquel ou heparina e as eluições foram realizadas com 300 µL de tampão B ou tampão de amostra para *SDS-PAGE* e incubadas a 96°C por 5 minutos. As eluições e resinas foram posteriormente analisadas por *SDS-PAGE* e *Western blot* para a identificação da proteína de interesse.

3.4. Purificação da proteína SFRP2 recombinante

A purificação de SFRP2 foi realizada por cromatografia de afinidade em sistema automatizado utilizando uma coluna de heparina, com base no protocolo descrito por Wolf *et al.* (2008) com algumas modificações.

Sobrenadantes obtidos a partir do cultivo de células HEK293T em garrafas de 75 cm² foram coletados de 24 h a 9 dias após a transfecção com o vetor pIRES2-EGFP-SFRP2 e centrifugados a 14000 rpm por 5 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram purificados no equipamento ÄKTApure 25 M1 (GE Healthcare Life Sciences) utilizando a coluna HiTrap™ Heparin HP 1 mL (GE Healthcare Life Sciences) previamente equilibrada com tampão A (50 mM tampão fosfato de sódio pH 7,4). O *flow-through* foi coletado em tubo falcon de 50 mL e momentaneamente armazenado em banho de gelo para posterior análise por *SDS-PAGE*. A lavagem da coluna foi realizada com 5 VC (volumes de coluna) de tampão A e o conteúdo foi armazenado para posterior análise por *SDS-PAGE*. Para a eluição foi utilizado um gradiente com tampão B (50 mM tampão fosfato de sódio pH 7,4; 2 M NaCl) da seguinte forma: 10 VC até 50% de tampão B seguido de 5 VC até 100% de tampão B. Todas as etapas foram realizadas com fluxo de 0,5 mL/min. Frações de 0,5 mL foram coletadas e armazenadas momentaneamente em banho de gelo para posterior análise por *SDS-PAGE* e/ou *Western blot*. Todas as soluções utilizadas durante a

purificação foram previamente filtradas a 0,45 µm e deaeradas por cerca de 20 minutos.

Após análise, as frações que apresentavam maior proporção da proteína SFRP2 em relação aos contaminantes foram purificadas por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC) utilizando a resina *Ni-NTA Superflow* conforme o protocolo descrito no item 3.3. As frações que continham a maior proporção da proteína SFRP2 em relação aos contaminantes foram unidas, diluídas em tampão A (50 mM tampão fosfato de sódio pH 7,4) para redução da concentração de sal e incubadas com 100 µL de resina previamente equilibrada em tampão A (50 mM tampão fosfato de sódio pH 7,4; 500 mM NaCl). As eluições foram realizadas com 100 µL de tampão B (50 mM tampão fosfato de sódio pH 7,4; 150 mM NaCl; 10% glicerol; 500 mM imidazol). A resina remanescente foi mantida em 75 µL de tampão B e tampão de amostra para *SDS-PAGE* e incubada a 96°C por 5 minutos. As amostras de eluição e resina foram posteriormente analisadas por *SDS-PAGE* para a identificação de SFRP2.

3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida e ensaios de *Western blot*

A presença de SFRP2 nos sobrenadantes de cultura e nas amostras purificadas foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (*SDS-PAGE*) e *Western blot*. As amostras foram preparadas conforme descrito por Laemmli (1970) e submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida 13%. Os géis foram corados com azul de Coomassie e descorados em solução contendo 30% de metanol e 10% de ácido acético. As análises no gel foram realizadas comparando-se as bandas obtidas para cada amostra com o marcador de massa molecular *Precision Plus Protein™ Unstained* (Bio-Rad) para determinação dos respectivos tamanhos.

Para a detecção da proteína por *Western blot*, após a eletroforese as amostras foram transferidas para membranas de PVDF previamente ativadas com metanol 100%. As transferências foram realizadas no equipamento *Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad), a 15 V por 30 minutos em tampão contendo 20% de metanol. O bloqueio foi realizado por 1 hora a temperatura ambiente em tampão TBS 1X contendo 5% de leite

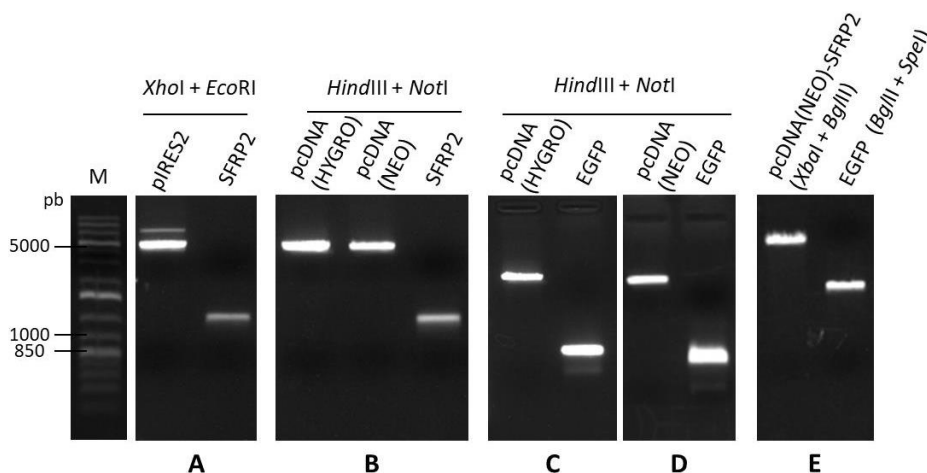
desnatado. As membranas foram posteriormente incubadas em solução contendo anticorpo primário contra cauda de histidinas (α -His MAB050, R&D Systems, diluição 1:3000 em TBST), a 4°C *overnight*. Após três lavagens de 10 minutos em tampão TBS 1X, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina (α -mouse AP A3886, diluição 1:30000 em TBST) por cerca de 2 h a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas três vezes em tampão TBS 1X e em seguida incubadas em tampão de fosfatase alcalina suplementado com os substratos *BCIP/NBT Color Development Substrate* (Promega Corp, Madison, Wisconsin, EUA) para revelação de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Alternativamente, as membranas foram incubadas com anticorpo contra cauda de histidinas conjugado à peroxidase (6x-His Tag Monoclonal Antibody HRP, Thermo Fisher Scientific, diluição 1:5000 em TBST) por cerca de 1 h a temperatura ambiente e reveladas por quimioluminescência utilizando os substratos *SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Fisher Scientific). Para a revelação, as membranas foram expostas por 20 minutos no fotodocumentador L-Pix Chemi Express (Loccus Biotecnologia).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Construção dos vetores

O vetor pIRES2-EGFP (Clontech), duas versões do vetor pcDNA™3.1 (Invitrogen®) modificado (SANTOS, 2016), contendo genes de resistência aos antibióticos neomicina ou higromicina, e os insertos das proteínas SFRP2 e EGFP amplificados por PCR foram digeridos com enzimas de restrição específicas, conforme descrito nos materiais e métodos, e purificados para posteriores subclonagens. As análises em gel de agarose 0,8% revelaram a presença de bandas com tamanho esperado para os respectivos insertos e vetores digeridos e purificados, possibilitando sua utilização nas reações de ligação subsequentes (**Figura 4**).

FIGURA 4: VETORES E INSERTOS PURIFICADOS APÓS DIGESTÃO. Géis de agarose 0,8% realizados para visualização dos vetores e insertos digeridos e purificados usados nas clonagens. A: vetor pIRES2-EGFP (5308 pb) e inserto de SFRP2 (895 pb) digeridos com as enzimas *XhoI* e *EcoRI*; B: vetores pcDNA™3.1 modificados (5500 pb) e inserto de SFRP2 (895 pb) digeridos com as enzimas *HindIII* e *NotI*; C e D: vetores pcDNA™3.1 modificados (5500 pb) e inserto de EGFP (713 pb) digeridos com as enzimas *HindIII* e *NotI*; E: vetor pcDNA(NEO)-SFRP2 digerido com as enzimas *XbaI* e *BglII* (6395 pb) e cassete de expressão de EGFP digerido com as enzimas *BglII* e *SpeI* (2400 pb). HYGRO e NEO representam os vetores pcDNA™3.1 modificados contendo genes de resistência aos antibióticos higromicina e neomicina, respectivamente. M: Marcador de massa molecular.



Os seis vetores construídos neste projeto encontram-se descritos na **Tabela 5**. O clone pIRES2-EGFP-SFRP2 (**Figura 5A**) foi construído visando à expressão da proteína humana SFRP2. Este vetor bicistrônico permite a transcrição da proteína de interesse e da proteína EGFP em um único mRNA; entretanto, a tradução de ambas ocorre de maneira independente, de modo que a proteína presente no primeiro cístron (SFRP2) é traduzida via *cap* 5', enquanto a tradução daquela presente no segundo cístron (EGFP) é mediada por um sítio de entrada interno para ribossomo (IRES, *Internal Ribosome Entry Site*).

Os vetores pcDNA(HYGRO)-SFRP2, pcDNA(NEO)-SFRP2, pcDNA(HYGRO)-EGFP e pcDNA(NEO)-EGFP foram construídos após as subclonagens dos insertos de SFRP2 e EGFP individualmente nas duas versões do vetor pcDNA™3.1 modificado. O cassete de expressão de EGFP foi obtido após a digestão do vetor pcDNA(NEO)-EGFP e posteriormente inserido no vetor pcDNA(NEO)-SFRP2 para a construção do clone pcDNA(NEO)-SFRP2-EGFP (**Figura 5B**). Neste clone, os cDNAs das proteínas SFRP2 e EGFP encontram-se em cassetes de expressão distintos, de modo que a

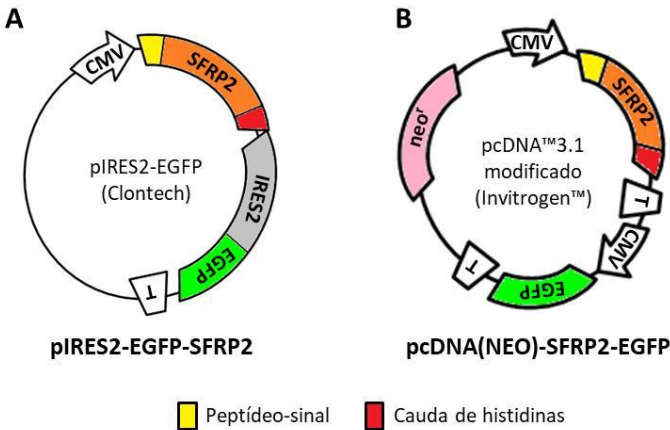
transcrição e tradução de ambas as proteínas ocorrem de maneira independente.

Os clones pIRES2-EGFP-SFRP2 e pcDNA(NEO)-SFRP2-EGFP foram posteriormente utilizados em transfecções de linhagens celulares de mamíferos para a expressão da proteína SFRP2. Em ambos os vetores, a proteína EGFP atuou como repórter, possibilitando a visualização das células transfectadas por microscopia de fluorescência.

TABELA 5: VETORES CONSTRUÍDOS.

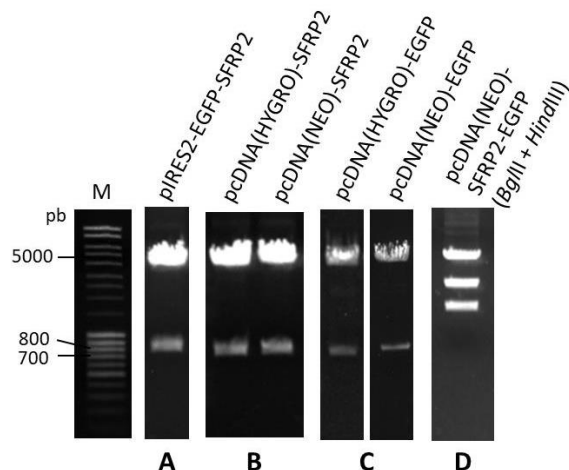
Nome do clone construído	Vetor utilizado para clonagem	Inserto	Sítios de clonagem
pIRES2-EGFP-SFRP2	pIRES2-EGFP	Proteína humana SFRP2 (código de acesso no GenBank: BC008666)	<i>XhoI</i> e <i>EcoRI</i>
pcDNA(HYGRO)-SFRP2	pcDNA3.1 (modificado)	Proteína humana SFRP2	<i>HindIII</i> e <i>NotI</i>
pcDNA(HYGRO)-EGFP	pcDNA3.1 (modificado)	Proteína EGFP	<i>HindIII</i> e <i>NotI</i>
pcDNA(NEO)-SFRP2	pcDNA3.1 (modificado)	Proteína humana SFRP2	<i>HindIII</i> e <i>NotI</i>
pcDNA(NEO)-EGFP	pcDNA3.1 (modificado)	Proteína EGFP	<i>HindIII</i> e <i>NotI</i>
pcDNA(NEO)-SFRP2-EGFP	pcDNA3.1 (modificado)	Proteína humana SFRP2 e proteína EGFP	<i>BglII</i> e <i>XbaI/SpeI</i>

FIGURA 5: ESQUEMA DOS VETORES UTILIZADOS PARA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA SFRP2. O vetor bicistrônico pIRES2-EGFP-SFRP2 (A) possibilita a transcrição das proteínas SFRP2 e EGFP em um único mRNA e apresenta um sítio de entrada interno para ribossomo (IRES2) para a tradução de EGFP de maneira independente. No vetor pcDNA(NEO)-SFRP2-EGFP (B) os cDNAs das duas proteínas encontram-se em cassetes de expressão distintos, possibilitando a transcrição e tradução de SFRP2 e EGFP de maneira independente. CMV: Promotor CMV. T: Terminador transcrional. Neo^r: Gene de resistência ao antibiótico neomicina.



Alíquotas da preparação do DNA plasmideal dos clones construídos foram digeridas com as respectivas enzimas de restrição e subsequentemente analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% a fim de confirmar a presença dos insertos nos respectivos vetores (**Figura 6**). Foram observadas bandas de tamanho correspondente ao esperado para todos os insertos, indicando o sucesso das subclonagens nos respectivos vetores de interesse. Os clones foram também analisados através de sequenciamento antes de sua utilização em etapas subsequentes.

FIGURA 6: DIGESTÕES DE CONFERÊNCIA DOS CLONES. Géis de agarose 0,8% realizados para análise das digestões de conferência dos clones (A) pIRES2-EGFP (5308 pb) contendo o inserto de SFRP2; pcDNATM3.1 (5500 pb) contendo os insertos de (B) SFRP2 (895 pb) e (C) EGFP (713 pb); e do clone (D) pcDNA(NEO)-SFRP2 contendo o cassete de expressão de EGFP. HYGRO e NEO representam as versões dos vetores pcDNATM3.1 contendo genes de resistência à higromicina e neomicina, respectivamente. O vetor pIRES2-EGFP foi digerido com *Xho*I e *Eco*RI para a liberação do inserto de SFRP2, enquanto os vetores pcDNATM3.1 foram digeridos com as enzimas *Hind*III e *Not*I e o clone pcDNA(NEO)-SFRP2-EGFP foi digerido com *Bgl*II e *Hind*III. M: Marcador de massa molecular.



4.2. Expressão de SFRP2 em linhagens celulares de mamíferos

4.2.1. Testes de expressão de SFRP2 recombinante

A expressão da proteína humana SFRP2 recombinante foi testada em pequena escala em diferentes linhagens celulares de mamíferos. Além de glicosilações, esta proteína apresenta uma grande quantidade de pontes dissulfeto devido à presença de 10 resíduos de cisteína na extremidade amino-terminal, os quais compõem um domínio CRD (*cysteine-rich domain*), bem

como de mais seis resíduos de cisteína na extremidade carboxi-terminal (CHONG *et al.* 2002). Assim, o sistema de expressão em células de mamíferos foi escolhido por possibilitar as modificações pós-traducionais e o correto enovelamento necessário para a obtenção de SFRP2 em sua forma ativa, uma vez que sistemas bacterianos e de leveduras não possuem as enzimas adequadas para o correto processamento desta proteína (KHAN, 2013; BANDARANAYAKE & ALMO, 2014).

A linhagem celular MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) foi selecionada para testar a expressão da proteína SFRP2 recombinante por ter sido descrita por Wolf *et al.* (2008) como capaz de secretar altos níveis de proteínas SFRP1 e SFRP2. Além disso, seu cultivo em ciclos alternados de três dias em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e três dias em DMEM sem soro possibilita a redução na quantidade de proteínas no sobrenadante das culturas celulares, contribuindo para a obtenção da proteína de interesse com maior grau de pureza. A expressão de SFRP2 também foi testada em células CHO-K1 e HEK293T. A linhagem CHO (*Chinese Hamster Ovary*) e suas derivadas, como CHO-K1, são as linhagens de mamíferos mais utilizadas para a produção de proteínas terapêuticas em escala industrial, em especial de anticorpos monoclonais (KHAN, 2013). Além de possibilitarem um alto rendimento na obtenção dos produtos, estas células podem ser facilmente adaptadas para o crescimento em suspensão e para o cultivo em meio desprovido de SFB, possibilitando a recuperação da proteína de interesse com menor quantidade de contaminantes (KHAN, 2013; BANDARANAYAKE & ALMO, 2014). Já a linhagem HEK293T (*Human Embryonic Kidney*), assim como diversas outras linhagens derivadas da HEK293 parental, é amplamente utilizada para a expressão de proteínas recombinantes, em especial de proteínas humanas, devido à sua fácil manutenção, alta eficiência de transfecção e capacidade de produzir proteínas com modificações pós-traducionais e funções biológicas mais similares às proteínas que ocorrem naturalmente em humanos (THOMAS & SMART, 2005; KHAN, 2013; BANDARANAYAKE & ALMO, 2014).

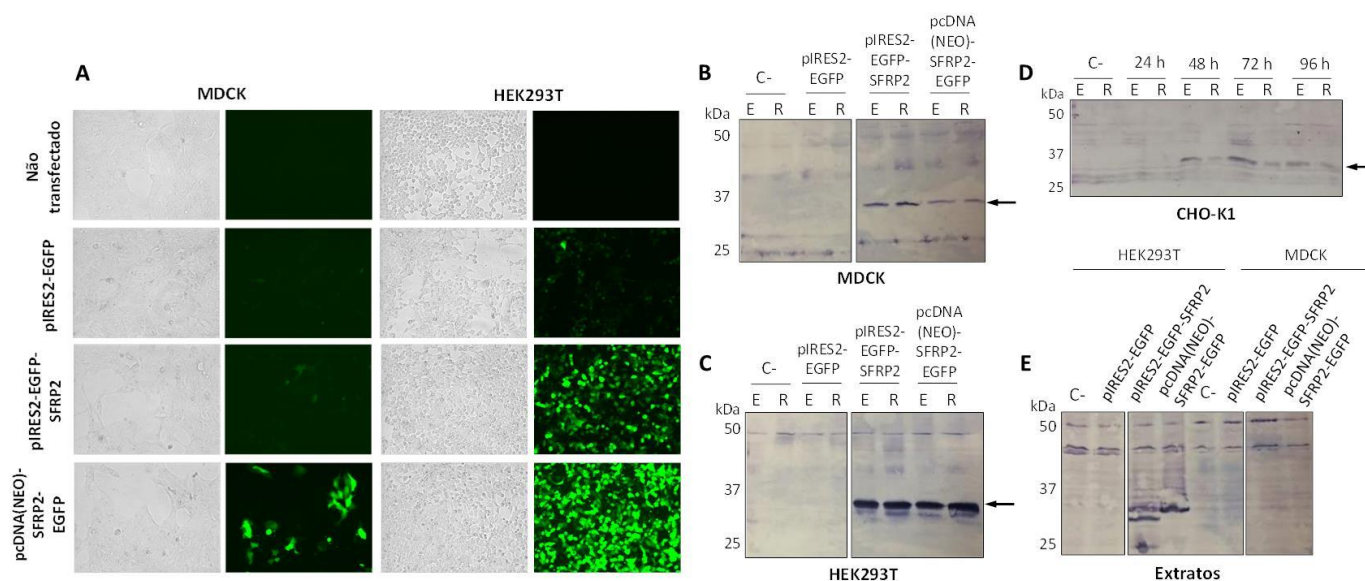
Inicialmente foram realizados testes em placas de cultura de seis poços para avaliar a eficiência de transfecção destas linhagens por lipossomo. A transfecção por lipossomo consiste em um método químico que se baseia na

formação de complexos entre lipídeos catiônicos e ácidos nucleicos negativamente carregados. Os complexos positivamente carregados são então atraídos à membrana plasmática negativamente carregada, atravessando-a e liberando o DNA exógeno no interior da célula, o qual será encaminhado ao núcleo para a expressão (KIM & EBERWINE, 2010). A eficiência de transfecção por lipossomo depende de fatores como a proporção entre os complexos lipídicos e ácidos nucleicos, o pH da solução e as condições da membrana celular, podendo variar de acordo com a linhagem a ser transfectada (KIM & EBERWINE, 2010). Células MDCK e HEK293T foram transfectadas com os vetores pIRES2-EGFP-SFRP2 e pcDNA(NEO)-SFRP2-EGFP e analisadas por microscopia de fluorescência para avaliar os níveis de fluorescência de EGFP. Uma amostra transfectada com o vetor pIRES2-EGFP vazio e outra não transfectada foram utilizadas como controles negativos de expressão (C-). Os extratos celulares e os sobrenadantes das culturas foram coletados 48 h após as transfecções para análise da expressão de SFRP2 e comparação dos níveis de proteína obtidos a partir de ambos os vetores testados. Células CHO-K1 foram transfectadas com o vetor pIRES2-EGFP-SFRP2 e os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados 24, 48, 72 e 96 h após a transfecção para avaliar a expressão da proteína recombinante em diferentes tempos. Os sobrenadantes obtidos a partir do cultivo das três linhagens foram incubados com a resina de afinidade *Ni-NTA Superflow*. A purificação em resina de níquel foi realizada devido à presença de uma cauda de histidinas na extremidade C-terminal da proteína SFRP2, adicionada durante as etapas prévias de subclonagem nos vetores de expressão. A resina foi lavada e posteriormente eluída com tampão B (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 800 mM imidazol). Foram analisadas as frações correspondentes ao eluído contendo tampão com imidazol e também a eluição feita diretamente da resina, aquecida com tampão de amostra para *SDS-PAGE*.

Análises por *Western blot* revelaram que a proteína SFRP2 foi expressa a partir de todas as linhagens testadas (**Figura 7**). A visualização de uma pequena quantidade de células EGFP⁺ indicou uma baixa eficiência de transfecção das células MDCK por lipossomo (**Figura 7A**), o que pode explicar os baixos níveis de expressão de SFRP2 detectados nesta linhagem (**Figura 7B**). A ausência de bandas correspondentes à SFRP2 nas amostras dos

extratos de células MDCK e HEK293T indicou que a proteína foi corretamente secretada para o sobrenadante das culturas celulares, sendo os maiores níveis detectados nos sobrenadantes de células HEK293T (**Figuras 7C e 7E**). Em ambas as linhagens, foram obtidos níveis semelhantes de SFRP2 recombinante a partir dos vetores pIRES2-EGFP-SFRP2 e pcDNA(NEO)-SFRP2-EGFP (**Figuras 7B e 7C**). Para a linhagem CHO-K1, os maiores níveis de expressão de SFRP2 foram obtidos 72 h após a transfecção (**Figura 7D**).

FIGURA 7: TESTES DE TRANSFEÇÃO POR LIPOSSOMO E EXPRESSÃO DE SFRP2 EM PEQUENA ESCALA. A: Análise da expressão de EGFP por microscopia de fluorescência de células MDCK e HEK293T transfectadas com os vetores pIRES2-EGFP, pIRES2-EGFP-SFRP2 e pcDNA(NEO)-SFRP2-EGFP. B, C, D, E: *Western blot* dos sobrenadantes de cultura de células MDCK (B), HEK293T (C) CHO-K1 (D) enriquecidos com resina de afinidade a níquel, coletados 48 h (MDCK e HEK293T) e 24, 48, 72 e 96 h (CHO-K1) após a transfecção. Os extratos celulares das linhagens HEK293T e MDCK também foram analisados (E). A presença de SFRP2 foi confirmada no sobrenadante das culturas celulares de todas as linhagens testadas, sendo os maiores níveis de expressão da proteína recombinante detectados a partir da linhagem HEK293T. C-: Amostras provenientes de culturas não transfectadas; E: Eluição com tampão B (contendo imidazol); R: Eluição feita diretamente da resina com tampão de amostra para *SDS-PAGE*. As setas indicam as bandas correspondentes à SFRP2 (34,5 kDa) em todas as análises realizadas.



4.2.2. Aumento da escala de expressão de SFRP2 recombinante

4.2.2.1. Expressão em células MDCK

Para a expressão de SFRP2 recombinante em maior escala, a transfecção de células MDCK foi testada por eletroporação, uma vez que o

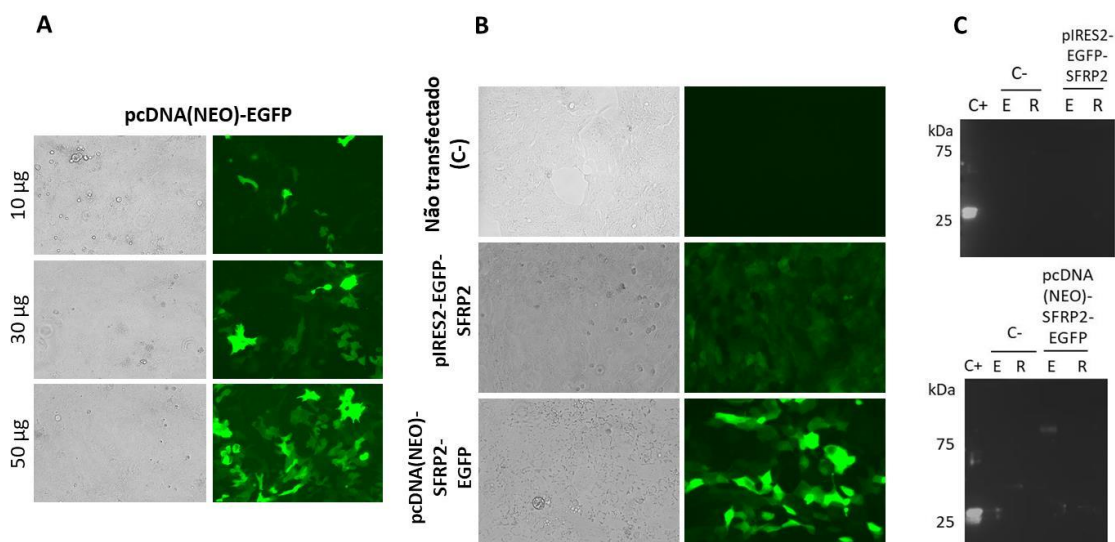
método do lipossomo não foi eficiente nesta linhagem. A eletroporação consiste em um método físico de transfecção em que um pulso elétrico curto induz temporariamente a formação de poros na membrana celular, através dos quais os ácidos nucleicos são capazes de passar (WONG & NEUMANN, 1982; KIM & EBERWINE, 2010). Além de fácil e rápida, esta técnica permite transfectar um grande número de células em um curto período de tempo e pode ser uma alternativa para linhagens celulares cuja eficiência de transfecção por métodos químicos é baixa (KIM & EBERWINE, 2010).

A transfecção da linhagem MDCK foi testada por eletroporação utilizando 5×10^6 células e 10, 30 ou 50 µg do vetor pcDNA(NEO)-EGFP. Pelas análises por microscopia de fluorescência foi possível observar uma eficiência de transfecção semelhante com a utilização de 30 e 50 µg de DNA plasmideal (**Figura 8A**). Desta forma, as células foram eletroporadas com 30 µg dos vetores pIRES2-EGFP-SFRP2 circular ou pcDNA(NEO)-SFRP2-EGFP linearizado com a enzima *PvuI* e selecionadas com antibiótico G418 visando à obtenção de linhagens estáveis para expressão de SFRP2. O estabelecimento de linhagens estáveis foi testado a fim de obter maiores quantidades da proteína SFRP2 sem a necessidade de transfecções sucessivas, as quais seriam inviáveis devido à grande quantidade de DNA plasmideal requerida para a eletroporação. Enquanto nas transfecções transientes o gene de interesse é expresso por um período de tempo limitado (em geral de 24 a 120 horas após a transfecção) devido à manutenção do DNA exógeno na forma episomal, as linhagens estáveis possibilitam a expressão contínua do gene de interesse devido à sua integração no genoma das células hospedeiras, o que permite sua replicação durante as divisões celulares e a consequente manutenção da expressão ao longo de várias gerações (SMITH, 2013).

As células selecionadas foram analisadas por microscopia de fluorescência e os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados após aproximadamente um mês de seleção para purificação com a resina *Ni-NTA Superflow*. Foram analisadas as frações correspondentes ao eluído contendo tampão com imidazol e também a eluição feita diretamente da resina, aquecida com tampão de amostra para *SDS-PAGE*. Surpreendentemente, apesar da grande quantidade de células EGFP⁺ (**Figura 8B**), não foi possível detectar a presença da proteína SFRP2 nas amostras analisadas por *Western blot*

(Figura 8C), indicando que a proteína não foi expressa ou secretada, ou ainda que foi degradada na linhagem MDCK nestas condições.

FIGURA 8: TESTES DE TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS MDCK POR ELETROPORAÇÃO E EXPRESSÃO DE SFRP2 EM MAIOR ESCALA. A: Análise da expressão de EGFP por microscopia de fluorescência de células MDCK eletroporadas com 10, 30 ou 50 µg do vetor pcDNA(NEO)-EGFP. B: Análise por microscopia de fluorescência de células MDCK transfectadas com os vetores pIRES2-EGFP-SFRP2 e pcDNA(NEO)-SFRP2-EGFP e selecionadas com antibiótico G418 para a obtenção de linhagens estáveis com altos níveis de expressão de SFRP2. C: *Western blot* dos sobrenadantes das culturas de células MDCK enriquecidos com incubação com a resina *Ni-NTA Superflow*, coletados um mês após a seleção com G418 das células transfectadas com os vetores para a expressão de SFRP2. C+: Proteína A fusionada a uma cauda de histidinas (28,8 kDa), utilizada como controle positivo do *Western blot*; C-: Amostras provenientes de culturas não transfectadas; E: Eluição com tampão B (contendo imidazol); R: Eluição feita diretamente da resina com tampão de amostra para *SDS-PAGE*. Apesar da grande quantidade de células MDCK EGFP⁺ (B), a presença de SFRP2 não foi detectada nas amostras analisadas por *Western blot* (C), indicando que a proteína recombinante não foi expressa ou secretada, ou ainda que foi degradada na linhagem MDCK nestas condições.



Embora os mecanismos moleculares de integração do DNA exógeno no cromossomo das células hospedeiras não seja completamente compreendido, acredita-se que esta integração ocorra, em grande parte dos casos, de maneira aleatória, o que pode resultar em uma grande variação nos níveis de expressão entre diferentes células (variação) e no silenciamento progressivo dos transgenes conforme o local de integração no genoma (MARTIN & WHITELAW, 1996; WHITELAW *et al.*, 2001; BANDARANAYAKE & ALMO, 2014; DALTON & BARTON, 2014). A integração em locais próximos a regiões heterocromáticas é um dos fatores que dificulta a expressão dos transgenes devido à estrutura da cromatina altamente repressiva à transcrição

(RECILLAS-TARGA, 2004). Além disso, rearranjos posteriores da cromatina gerados por fatores epigenéticos, como modificações covalentes de histonas e metilação do DNA, também podem resultar na formação de estruturas repressivas ao redor dos sítios de integração, levando à interrupção completa da expressão do transgene ao longo do tempo (WHITELAW *et al.*, 2001; RECILLAS-TARGA, 2004; KAUFMAN *et al.*, 2008; DALTON & BARTON, 2014). Uma possível explicação para o resultado obtido após a seleção da linhagem MDCK consiste na integração dos vetores de maneira parcial, apresentando deleções (RECILLAS-TARGA, 2004), de modo que o fragmento correspondente ao transgene da SFRP2 não foi inserido no genoma. Outra possibilidade é que as unidades transcricionais de SFRP2 e EGFP tenham sido integradas em locais distintos do genoma das células, em especial no caso do vetor pcDNA(NEO)-SFRP2-EGFP, em que os cDNAs das duas proteínas encontram-se em cassetes de expressão distintos. Nesta situação, ao contrário do transgene de EGFP, a unidade transcricional da proteína SFRP2 pode ter sido integrada em sítios próximos a regiões heterocromáticas, o que explicaria a ausência da proteína recombinante no sobrenadante das culturas celulares apesar da visualização de células fluorescentes. Pode também ter ocorrido um silenciamento progressivo do transgene da SFRP2 após sua inserção no genoma devido a características particulares do próprio transgene, como a composição de nucleotídeos do DNA exógeno (WHITELAW *et al.*, 2001; KAUFMAN *et al.*, 2008).

Além da repressão transcricional, outra possível explicação para a ausência de SFRP2 consiste na inibição da tradução e/ou secreção da proteína recombinante. A síntese, o dobramento e a glicosilação inicial de proteínas secretadas ocorrem no interior do retículo endoplasmático (RE), onde se encontram diversas enzimas e chaperonas que auxiliam na formação da estrutura terciária, no dobramento e na prevenção da agregação, a fim de garantir o correto processamento destas proteínas (CUDNA & DICKSON, 2003). Proteínas mal dobradas ou incorretamente glicosiladas são retidas no RE e posteriormente degradadas no interior desta organela ou transportadas ao citosol para degradação pela maquinaria proteossomal (CUDNA & DICKSON, 2003; SCHRÖDER & KAUFMAN, 2005). O acúmulo em excesso de proteínas mal dobradas pode culminar em um fenômeno conhecido como

estresse de retículo. Nesta situação, são desencadeados diversos mecanismos celulares que podem resultar no descongestionamento do RE e restabelecimento de suas funções normais, na inibição da síntese proteica ou, em casos extremos, na apoptose (CUDNA & DICKSON, 2003). No caso da linhagem MDCK, podem ter sido selecionadas as células que apresentavam altos níveis de expressão de SFRP2. Em se tratando de uma proteína secretada, a superexpressão desta proteína recombinante pode ter impedido sua correta maturação no RE, ocasionando seu acúmulo e o consequente congestionamento do retículo. Desta forma, a síntese proteica pode ter sido reprimida e as proteínas incorretamente processadas podem ter sido direcionadas a vias de degradação, o que explicaria a ausência da SFRP2 no sobrenadante das culturas celulares.

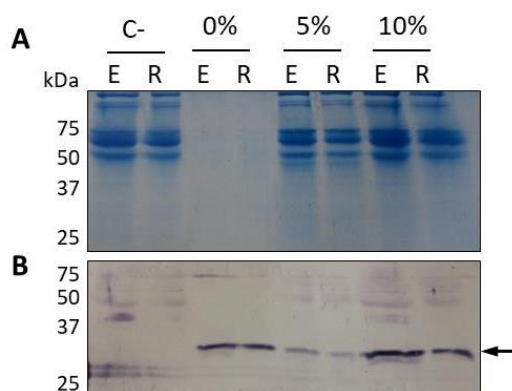
Uma vez que não foi possível a obtenção de SFRP2 em maior escala na linhagem MDCK, as linhagens CHO-K1 e HEK293T foram testadas para o aumento da escala de expressão da proteína recombinante.

4.2.2.2. Expressão em células CHO-K1 e testes para redução do soro no meio de cultura

Células da linhagem CHO-K1 foram transfectadas por lipossomo com o vetor pIRES2-EGFP-SFRP2 para expressão da proteína SFRP2 recombinante em maior escala. Sabe-se que o soro utilizado no cultivo celular contém proteínas que podem interferir em processos subsequentes de purificação das proteínas recombinantes (RECILLAS-TARGA, 2004). Assim, para reduzir a quantidade de contaminantes na amostra e facilitar a purificação de SFRP2, o cultivo das células transfectadas foi testado em meio Opti-MEM I, que permite reduzir a concentração de SFB. Inicialmente foi testada a expressão em pequena escala utilizando placas de seis poços e 2 mL de meio de cultura suplementado com 0, 5 e 10% SFB. Os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados 72 h após a transfecção e incubados com a resina de afinidade *Ni-NTA Superflow*. A resina foi lavada e posteriormente eluída com tampão B, contendo imidazol. Foram analisadas as frações correspondentes ao eluído contendo tampão com imidazol e também a eluição direta da resina, aquecida com tampão de amostra para *SDS-PAGE*. Embora a proteína não

tenha sido detectada na análise por *SDS-PAGE* (**Figura 9A**), a expressão de SFRP2 recombinante foi confirmada por *Western blot* em todas as condições testadas (**Figura 9B**). O cultivo em meio desprovido de soro possibilitou uma grande redução na quantidade de contaminantes concomitantemente à obtenção de SFRP2 em níveis semelhantes ao cultivo com 10% SFB. Assim, o cultivo em meio Opti-MEM I sem soro foi escolhido para testar a expressão da proteína recombinante em maior escala nesta linhagem.

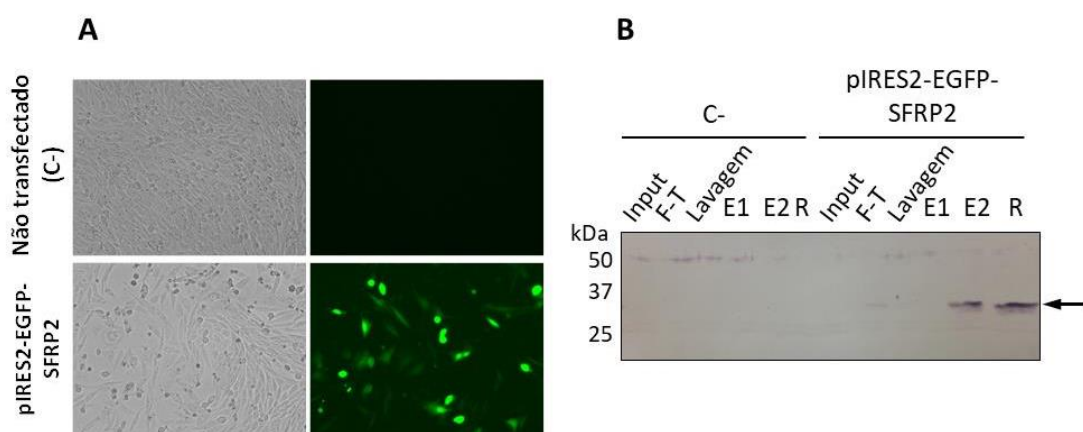
FIGURA 9: TESTES PARA REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SORO NO MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS CHO-K1. O cultivo de células CHO-K1 transfectadas com o vetor pIRES2-EGFP-SFRP2 foi testado em meio Opti-MEM I sem soro ou suplementado com 5 ou 10% SFB. Os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados 72 h após a transfecção para purificação com resina de níquel e analisados por *SDS-PAGE* (A) e *Western blot* (B). A proteína SFRP2 foi detectada apenas por *Western blot* em todas as condições testadas. C-: Sobrenadante de células não transfectadas, cultivadas em meio contendo 10% SFB; E: Eluição com tampão B (contendo imidazol); R: Eluição feita diretamente da resina com tampão de amostra para *SDS-PAGE*. A seta indica as bandas correspondentes à SFRP2 (34,5 kDa).



Para o aumento da escala de expressão de SFRP2, as células transfectadas foram cultivadas em garrafas de 75 cm² e analisadas por microscopia de fluorescência para avaliar os níveis de fluorescência de EGFP (**Figura 10A**). Os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados 72 h após a transfecção para purificação com a resina *Heparin Sepharose*[™] 6 *Fast Flow*. A purificação com resina de heparina foi testada devido à presença de um motivo NTR na extremidade C-terminal da proteína SFRP2, o qual lhe confere propriedades de ligação à heparina (UREN *et al.* 2000). A resina foi lavada e posteriormente eluída com tampão B1 (50 mM tampão fosfato de sódio pH 7,4; 750 mM NaCl) (eluição 1) ou B2 (50 mM tampão fosfato de sódio pH 7,4; 1,5 M NaCl) (eluição 2). Foram analisadas as frações correspondentes aos eluídos com os tampões B1 e B2 e a eluição feita diretamente da resina,

aquecida com tampão de amostra para *SDS-PAGE*. A presença de SFRP2 foi confirmada por *Western blot* nas amostras eluídas em tampão B2 que contém maior quantidade de sal (**Figura 10B**); entretanto, os baixos níveis de SFRP2 detectados indicaram um baixo rendimento na expressão da proteína recombinante a partir da linhagem CHO-K1 nessas condições.

FIGURA 10: EXPRESSÃO DE SFRP2 EM MAIOR ESCALA NA LINHAGEM CHO-K1. A: Análise por microscopia de fluorescência de células CHO-K1 transfectadas com o vetor pIRES2-EGFP-SFRP2 e cultivadas em meio Opti-MEM I sem soro. B: *Western blot* dos sobrenadantes das culturas celulares coletados 72 h após a transfecção e purificados com resina de heparina. C-: Sobrenadante de células não transfectadas; E1 e E2: Eluições com tampão B1 ou B2, respectivamente; R: Eluição feita diretamente da resina com tampão contendo 1,5 M NaCl e tampão de amostra para *SDS-PAGE*. A seta indica as bandas correspondentes à proteína SFRP2 (34,5 kDa). Os baixos níveis de SFRP2 detectados por *Western blot* (B) indicaram um baixo rendimento na expressão da proteína recombinante a partir da linhagem CHO-K1.



Devido ao baixo rendimento de proteína SFRP2 recombinante obtido com esta linhagem, optou-se pela utilização da linhagem HEK293T para a expressão da proteína SFRP2 em maior escala.

4.2.2.3. Expressão em células HEK293T e testes para redução do soro no meio de cultura

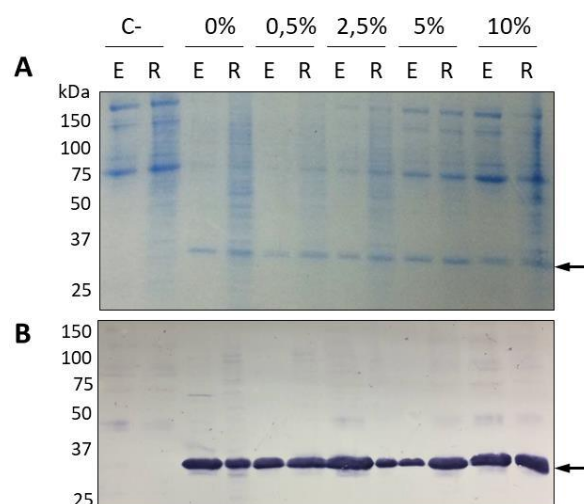
Células da linhagem HEK293T foram transfectadas com o vetor pIRES2-EGFP-SFRP2 para expressão em maior escala da proteína SFRP2 recombinante. Além de possibilitar a obtenção de níveis semelhantes da proteína de interesse quando comparado ao vetor pcDNA(NEO)-SFRP2-EGFP em pequena escala nesta linhagem, o vetor pIRES2-EGFP-SFRP2 foi

escolhido para o aumento da escala de expressão devido ao seu caráter bicistrônico, possibilitando a transcrição das proteínas SFRP2 e EGFP em um único mRNA. Assim, embora ambas as proteínas sejam traduzidas de maneira independente – a tradução de SFRP2 ocorre via *cap* 5', enquanto a tradução de EGFP é mediada por um sítio de entrada interno para ribossomo –, a presença do repórter EGFP e a consequente fluorescência das células são indicativos da expressão de SFRP2 a nível transcricional. Alternativamente, no vetor pcDNA(NEO)-SFRP2-EGFP as proteínas SFRP2 e EGFP são expressas a partir de cassetes distintos, de modo que tanto a transcrição quanto a tradução de cada proteína ocorrem de maneira independente, não sendo possível fazer nenhuma correlação direta entre a presença do repórter EGFP e a expressão de SFRP2. Ademais, a linhagem HEK293T apresenta modificações no genoma que determinam a expressão estável do antígeno T de SV40, o qual suporta a replicação episomal de plasmídeos que contêm a origem SV40, como é o caso do vetor pIRES2-EGFP-SFRP2, prolongando a expressão do gene de interesse após a transfecção transiente (GEISSE & FUX, 2009; BANDARANAYAKE & ALMO, 2014; DALTON & BARTON, 2014) e permitindo a recuperação de maiores níveis de proteína recombinante mesmo sem o estabelecimento de uma linhagem estável.

O cultivo das células transfectadas foi testado em meio Opti-MEM I visando à redução da concentração de SFB no sobrenadante das culturas celulares, uma vez que as proteínas do soro frequentemente interferem nas purificações de proteínas recombinantes expressas em sistemas eucarióticos (RECILLAS-TARGA, 2004). Inicialmente foi testada a expressão da proteína SFRP2 em pequena escala utilizando placas de seis poços e 2 mL de meio de cultura suplementado com 0, 0,5, 2,5, 5 e 10% SFB. Os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados 72 h após a transfecção e incubados com a resina de afinidade *Ni-NTA Superflow*. A resina foi lavada e posteriormente eluída com tampão contendo imidazol. Foram analisadas as frações correspondentes ao eluído contendo tampão com imidazol e também a eluição feita diretamente da resina, aquecida com tampão de amostra para *SDS-PAGE*. A expressão de SFRP2 recombinante foi visualizada por *SDS-PAGE* corado com Coomassie e a presença da proteína de interesse foi confirmada por *Western blot* em todas as condições testadas (**Figura 11**). Apesar de todas

as condições testadas apresentarem níveis semelhantes de SFRP2, os cultivos em meios sem soro e na presença de 0,5% SFB resultaram em uma grande quantidade de células mortas e pouca expressão de SFRP2 no aumento da escala para a expressão nas garrafas de 75 cm² (dados não mostrados). Já o cultivo em meio suplementado com 2,5% SFB possibilitou uma grande redução na quantidade de contaminantes concomitantemente à obtenção de SFRP2 em níveis semelhantes às demais condições testadas com maior quantidade de soro. Além disso, as células apresentaram boa viabilidade nesta condição. Sendo assim, o cultivo em meio Opti-MEM I suplementado com 2,5% SFB foi escolhido para a expressão de SFRP2 em maior escala e posterior purificação da proteína de interesse por cromatografia de afinidade.

FIGURA 11: TESTE PARA REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SORO NO MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS HEK293T. *SDS-PAGE* (A) e *Western blot* (B) dos sobrenadantes enriquecidos com resina de níquel, coletados 72 h após a transfecção de células HEK293T com o vetor pIRES2-EGFP-SFRP2. As células foram cultivadas em meio Opti-MEM I sem soro ou suplementado com 0,5, 2,5, 5 ou 10% SFB. C-: Sobrenadante de células não transfectadas, cultivadas em meio contendo 10% SFB; E: Eluição com tampão B (contendo imidazol); R: Eluição feita diretamente da resina com tampão de amostra para *SDS-PAGE*. A seta indica as bandas correspondentes à proteína SFRP2 (34,5 kDa).

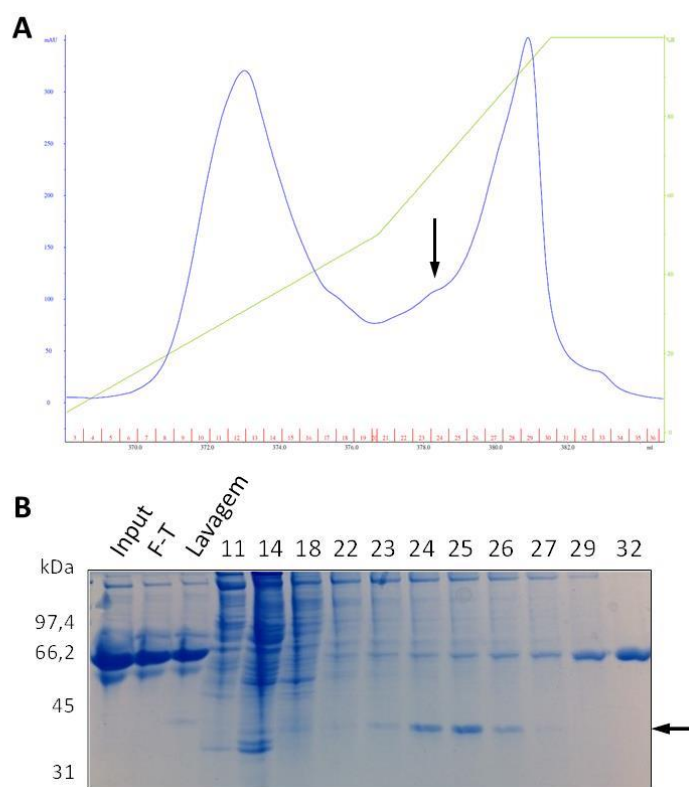


4.3. Purificação de SFRP2 recombinante

Sobrenadantes de células HEK293T cultivadas em garrafas de 75 cm² foram coletados de 24 h a 9 dias após a transfecção com o vetor pIRES2-EGFP-SFRP2 para purificação da proteína SFRP2 recombinante. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de heparina, uma vez que a proteína SFRP2 apresenta um motivo NTR que lhe confere grande

afinidade por este composto aniônico (UREN *et al.* 2000). As análises por *SDS-PAGE* das amostras coletadas após a purificação de 360 mL de sobrenadante revelaram a presença de bandas com tamanho esperado para a proteína de interesse nas frações correspondentes à eluição com cerca de 1,3 M NaCl (**Figura 12B**).

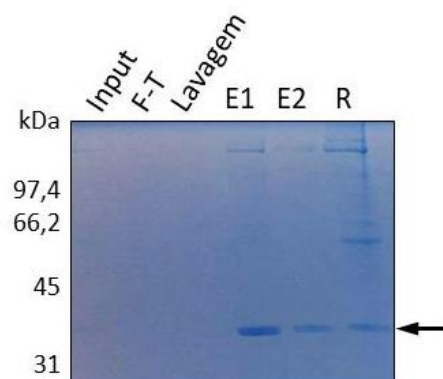
FIGURA 12: ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO DE SFRP2 EM COLUNA DE HEPARINA. A: Cromatograma obtido após a purificação de SFRP2 por cromatografia de afinidade utilizando a coluna HiTrap Heparin HP. B: Análise por *SDS-PAGE* das amostras obtidas após a purificação de 360 mL de amostra. *Input*: Alíquota da amostra injetada na coluna; *F-T*: Alíquota do *flow-through* resultante da amostra injetada que não ligou na coluna; Números: Frações coletadas durante a etapa de eluição com gradiente de NaCl. As setas indicam o pico de eluição de SFRP2 (A) e as bandas correspondentes à proteína SFRP2 de 34,5 kDa (B).



Devido à presença de algumas bandas correspondentes às demais proteínas presentes no sobrenadantes de cultura, uma segunda etapa de purificação foi realizada a fim de aumentar o grau de pureza de SFRP2. As frações 24, 25 e 26 (**Figura 12B**) obtidas após a eluição com tampão B foram unidas, diluídas em tampão A (50 mM tampão fosfato de sódio pH 7,4) para a redução da concentração de sal e incubadas com a resina de afinidade *Ni-NTA Superflow*. Após a lavagem da resina, foram realizadas duas eluições com

tampão B (50 mM tampão fosfato de sódio pH 7,4; 150 mM NaCl; 10% glicerol; 500 mM imidazol). As amostras correspondentes aos eluídos em tampão B e à eluição feita diretamente da resina, aquecida com tampão de amostra para *SDS-PAGE*, foram posteriormente analisadas por *SDS-PAGE*. A purificação por IMAC utilizando a resina de níquel resultou na separação da proteína SFRP2 da maioria dos contaminantes remanescentes nas amostras após a cromatografia em coluna de heparina, possibilitando a obtenção da proteína recombinante com o alto grau de pureza necessário para sua utilização em etapas subsequentes deste projeto (**Figura 13**).

FIGURA 13: ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO DE SFRP2 COM RESINA DE NÍQUEL. Frações da eluição obtidas após a purificação da proteína SFRP2 em coluna de heparina foram unidas para uma segunda etapa de purificação utilizando a resina de afinidade *Ni-NTA Superflow*. As amostras obtidas após a purificação por IMAC foram analisadas por *SDS-PAGE*. *Input*: Alíquota da amostra incubada com a resina; F-T: Alíquota do *flow-through* resultante da amostra que não ligou na resina; E1 e E2: Primeira e segunda eluição com tampão B, respectivamente; R: Eluição feita diretamente da resina com tampão de amostra para *SDS-PAGE*. A seta indica as bandas correspondentes à proteína SFRP2 (34,5 kDa).



Uma vez otimizado o protocolo de purificação, a proteína SFRP2 purificada será posteriormente utilizada em ensaios funcionais para avaliar sua atuação como oncoproteína ou supressora tumoral em linhagens celulares de origem leucêmica.

As vias de sinalização Wnt – em especial a via canônica – encontram-se desreguladas em diversos tipos de câncer, estando esta desregulação em muitos casos associada à modificações epigenéticas e alterações nos níveis de expressão de diferentes moduladores destas vias, como no caso das proteínas da família SFRP (RUBIN *et al.*, 2006; ZIMMERMAN, MOON & CHIEN, 2012; CRUCIAT & NIEHRS, 2013). A proteína SFRP2 atua majoritariamente como

antagonista das vias Wnt (CRUCIAT & NIEHRS, 2013) e apresenta um papel controverso na progressão e supressão de tumores, podendo atuar como oncogene ou supressora tumoral dependendo do contexto celular. Tendo em vista que o promotor de SFRP2 encontra-se hipermetilado em diversos tipos de leucemia (ROMAN-GOMEZ *et al.*, 2004; VALENCIA *et al.*, 2009; GRIFFITHS *et al.*, 2010; CHENG *et al.*, 2011; MOSKALEV *et al.*, 2012; GHASEMI *et al.*, 2015) e correlaciona-se à redução dos níveis de expressão desta proteína e à ativação constitutiva da via Wnt em AML (JOST *et al.*, 2008; VALENCIA *et al.*, 2009; GUO *et al.*, 2017), é possível que a proteína SFRP2 seja capaz de inibir a via Wnt e a proliferação celular em células leucêmicas, podendo atuar como supressora tumoral. Entretanto, até o momento nenhum estudo foi realizado para investigar diretamente o papel que esta proteína apresenta neste contexto celular. Desta forma, a proteína SFRP2 purificada obtida neste trabalho será utilizada em ensaios funcionais para avaliar a ativação ou inibição da via Wnt, bem como o papel que esta proteína apresenta sobre a proliferação e viabilidade celular em linhagens celulares de origem leucêmica. As linhagens Jurkat e Molt-4 derivadas de leucemia linfóide aguda serão incubadas com diferentes concentrações da proteína SFRP2 na presença ou ausência do ativador da via Wnt canônica, a proteína Wnt3a. A ativação ou inibição desta via será avaliada por (1) qPCR para análise da expressão dos genes-alvo da via, como *Axin2*, *CCND1* e *c-myc*; (2) *Western blot* para análise dos níveis de β -catenina; e (3) ensaios de luciferase utilizando o sistema TOP/FOP, em que o plasmídeo repórter TOP contém o gene da luciferase sob controle da região consenso do promotor TCF/LEF, enquanto o FOP possui essa região mutada e não pode ser ativado por β -catenina, servindo como controle negativo. Ensaios de cristal violeta e de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) também serão realizados para avaliar a proliferação e viabilidade celular (respectivamente) após a incubação das células com a proteína purificada. Essas análises ajudarão a compreender o papel da proteína SFRP2 em células leucêmicas a fim de avaliar seu possível uso terapêutico para o tratamento das leucemias, caso esta proteína atue como supressora tumoral.

5. CONCLUSÕES

A expressão da proteína humana SFRP2 foi testada nas linhagens celulares de mamíferos MDCK, CHO-K1 e HEK293T a partir dos vetores pIRES2-EGFP-SFRP2 e pcDNA(NEO)-SFRP2-EGFP. Apesar da proteína ter sido expressa de forma transiente na linhagem MDCK, a presença de SFRP2 não foi detectada no sobrenadante das culturas celulares selecionadas com antibiótico G418, indicando que a proteína recombinante não foi expressa ou secretada, ou que foi degradada nestas condições. Alternativamente, a proteína recombinante foi detectada com sucesso no sobrenadante de células CHO-K1 e HEK293T após transfecções transientes. Devido aos maiores níveis de proteína recombinante obtidos, a linhagem HEK293T foi escolhida para o aumento da escala de expressão de SFRP2 a partir do vetor bicistrônico pIRES2-EGFP-SFRP2. O cultivo das células transfectadas em meio de cultura suplementado com 2,5% SFB possibilitou a redução na quantidade de proteínas presentes no sobrenadante das culturas celulares, facilitando a purificação de SFRP2. Após purificações por cromatografia de afinidade em coluna de heparina e com resina de níquel, a proteína SFRP2 recombinante foi obtida com alto grau de pureza e será posteriormente utilizada em ensaios funcionais em linhagens celulares de origem leucêmica para avaliação de seu potencial terapêutico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANASTAS, J.N.; MOON, R.T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. **Nat Rev Cancer** v.13, p.11-26, 2012.

BANDARANAYAKE, A.D.; ALMO, S.C. Recent advances in mammalian protein production. **FEBS Lett**, v. 588(2), p. 253-60, 2014.

BLAGODATSKI, A.; POTERYAEV, D.; KATANAEV, V.L. Targeting the Wnt pathways for therapies. **Mol Cell Ther** v.2, p.28. 2014.

BOVOLENTA, P.; ESTEVE, P.; RUIZ, J.M.; CISNEROS, E.; LOPEZ-RIOS, J. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. **J Cell Sci** v.121, p.737-746, 2008.

CARRUBA, G.; CERVELLO, M.; MICELI, M.D.; FARRUGGIO, R.; NOTARBARTOLO, M.; VIRUSO, L.; GIANNITRAPANI, L.; GAMBINO, R.; MONTALTO, G.; CASTAGNETTA, L. Truncated form of beta-catenin and reduced expression of wild-type catenins feature HepG2 human liver cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* v. 886, p. 212-6, 1999.

CHEN, L.; LI, M.; LI, Q.; WANG, C.; XIE, S. DKK1 promotes hepatocellular carcinoma cell migration and invasion through β -catenin/MMP7 signalling pathway. **Mol Cancer** v.12, p.157, 2013.

CHENG, A.S.L.; LAU, S.S.; CHEN, Y.; KONDO, Y.; LI, M.S.; FENG, H.; CHING, A.K.; CHEUNG, K.F.; WONG, H.K.; TONG, J.H.; *et al.* EZH2-mediated concordant repression of Wnt antagonists promotes β -catenin-dependent hepatocarcinogenesis. **Cancer Res** v.71, p.4028–4039, 2011.

CHENG, C.K.; LI, L.; CHENG, S.H.; NG, K.; CHAN, N.P.; IP, R.K.; WONG, R.S.; SHING, M.M.; LI, C.K.; NG, M.H. Secreted frizzled related protein 1 is a transcriptional repression target of the t(8;21) fusion protein in acute myeloid leukemia. **Blood** v.118, p.6638-6648, 2011.

CHONG, J.M.; UREN, A.; RUBIN, J.S.; SPEICHER, D.W. Disulfide bond assignments of secreted Frizzled-related protein-1 provide insights about Frizzled homology and netrin modules. **J Biol Chem** v. 277, p. 5134-5144, 2002.

CHUNG, M.T.; LAI, H.C.; SYTWU, H.K.; YAN, M.D.; SHIH, Y.L.; CHANG, C.C.; YU M.H.; LIU, H.S.; CHU, D.W.; LIN, Y.W. SFRP1 and SFRP2 suppress the transformation and invasion abilities of cervical cancer cells through Wnt signal pathway. **Gynecol Oncol** v.112, p.646–653, 2009.

CRUCIAT, C.M.; NIEHRS, C. Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators. **Cold Spring Harb Perspect Biol** v. 5. a015081, 2013.

CUDNA, R.E.; DICKSON, A.J. Endoplasmic Reticulum Signaling as a Determinant of Recombinant Protein Expression. **Biotechnol Bioeng** v.81(1), p.56-65, 2003.

DALTON, A.C.; BARTON, W.A. Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines. **Protein Sci** v.23(5), p.517-25, 2014.

ESTEVE, P.; BOVOLENTA, P. The advantages and disadvantages of sfrp1 and sfrp2 expression in pathological events. **Tohoku J Exp Med** v. 221(1), p. 11-7, 2010.

FONTENOT, E.; ROSSI, E.; MUMPER, R.; SNYDER, S.; SIAMAKPOUR-REIHANI, S.; MA, P.; HILLIARD, E.; BONE, B.; KETELSEN, D.; SANTOS, C. *et al.* A novel monoclonal antibody to secreted frizzled-related protein 2 inhibits tumor growth. **Mol Cancer Ther** v.12, p.685–695, 2013.

GEISSE, S.; FUX, C. Recombinant protein production by transient gene transfer into Mammalian cells. **Methods Enzymol** v.463, p.223-38, 2009.

GHASEMI, A.; ROSTAMI, S.; CHAHARDOULI, B.; GHANDFOROSH, N.A.; GHOTASLOU, A.; NADALI, F. Study of SFRP1 and SFRP2 methylation status in patients with de novo acute myeloblastic leukemia. **Int J Hematol Stem Cell Res** v.9, p.15–21, 2015.

GONZALES-SANCHO, J.M.; AGUILERA, O.; GARCIA, J.M.; PENDAS-FRANCO, N.; PEÑA, C.; CAL, S.; GARCIA DE HERREROS, A.; BONILLA, F.; MUÑOZ, A. The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. **Oncogene** v.24(6), p.1098-103, 2005.

GORDON, M.D.; NUSSE, R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. **J Biol Chem** v.281, p.22429–22433, 2006.

GÖTZE, S.; WOLTER, M.; REIFENBERGER, G.; MÜLLER, O.; SIEVERS, S. Frequent promoter hypermethylation of Wnt pathway inhibitor genes in malignant astrocytic gliomas. **Int J Cancer** v. 126(11), p. 2584-93, 2010.

GRIFFITHS, E.; GORE, S.D.; HOOKER, C.; McDEVITT, M.; KARP, J.E.; SMITH, B.D.; MOHAMMAD, H.P.; YE, Y.; HERMAN, J.G.; CARRAWAY, H.E. Acute myeloid leukemia is characterized by Wnt pathway inhibitor promoter hypermethylation. **Leuk Lymphoma** v.51, p.1711–1719, 2010.

GUO, H.; ZHANG, T.; WEN, X.; ZHOU, J.; MA, J.; AN, C.; ZHANG, W.; XU, Z.; LIN, J.; QIAN, J. Hypermethylation of secreted frizzled-related proteins predicts poor prognosis in non-M3 acute myeloid leukemia. **Onco Targets Ther** v.10, p.3635-44, 2017.

HATSELL, S.; ROWLANDS, T.; HIREMATH, M.; COWIN, P. Beta-catenin and Tcfs in mammary development and cancer. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v.8, p.145–158, 2003.

HE, X.; SAINT-JEANNET, J.P.; WANG, Y.; NATHANS, J.; DAWID, I.; VARMUS, H. A member of the Frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5A. **Science** v.275, p.1652–1654, 1997.

HIRATA, H.; HINODA, Y.; NAKAJIMA, K.; KAWAMOTO, K.; KIKUNO, N.; UENO, K.; YAMAMURA, S.; ZAMAN, M.S.; KHATRI, G.; CHEN, Y.; SAINI, S.; MAJDI, S.; DENG, G.; ISHII, N.; DAHIYA, R. Wnt antagonist DKK1 acts as a tumor suppressor gene that induces apoptosis and inhibits proliferation in human cell carcinoma. **Int J Cancer** v.128 (8), p.1793-803, 2011.

JAMIESON, C.H.; AILLES, L.E.; DYLLA, S.J.; MUIJTJENS, M.; JONES, C.; ZEHNDER, J.L.; GOTLIB, J.; LI, K.; MANZ, M.G.; KEATING, A.; SAWYERS, C.L.; WEISSMAN, I.L. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. **N Engl J Med**. v. 12, p. 657-667, 2004.

JIANG, Y-G.; LUO, Y.; HE, D.; LI, X.; ZHANG, L.; PENG, T.; LI, M-C.; LIN, Y-H. Role of Wnt/beta-catenin signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition of human prostate cancer induced by hypoxia-inducible factor-1alpha. **Int J Urol** v.14, p.1034–1039, 2007.

JOST, E.; SCHMID, J.; WILOP, S.; SCHUBET, C.; SUZUKI, H.; HERMAN, J.G.; OSIEKA, R.; GALM, O. Epigenetic inactivation of secreted Frizzled-related proteins in acute myeloid leukaemia. **Br J Haematol** v.142(5), p.745-53, 2008.

KAUFMAN, W.L.; KOCHAN, I.; AGRAWAL, V.; RAHN, H-P.; BESSER, D.; GOSSEN, M. Homogeneity and persistence of transgene expression by omitting antibiotic selection in cell line isolation. **Nucleic Acids Research** v.36 (17) doi: 10.1093/nar/gkn508, 2008.

KHAN, K.H. Gene Expression in Mammalian Cells and its Applications. **Adv Pharm Bull** v. 3(2), p. 257-263, 2013.

KIKUCHI, A.; YAMAMOTO, H.; SATO, A.; MATSUMOTO, S. New Insights into the Mechanism of Wnt Signaling Pathway Activation. **Int Rev Cell Mol Biol.**, v. 291, p. 21-71, 2011.

KIM, T.K.; EBERWINE, J.H. Mammalian cell transfection: the present and the future. **Anal Bioanal Chem** v. 397(8), p. 3173-3178, 2010.

KITISIN, K.; PISHVAIAN, M.J.; JOHNSON, L.B.; MISHRA, L. Liver Stem Cells and Molecular Signaling Pathways in Hepatocellular Carcinoma. **Gastrointest Cancer Res** v. 1(4 Suppl 2), S13-21, 2007.

KOMIYA, Y.; HABAS, R. Wnt signal transduction pathways. **Organogenesis**, v. 4(2), p. 68-75, 2008.

KONGKHAM, P.N.; NORTHCOTT, P.; CROUL, S.E.; SMITH, C.; TAYLOR, M.D.; RUTKA, J.T. The SFRP family of WNT inhibitors function as novel tumor suppressor genes epigenetically silenced in medulloblastoma. **Oncogene** v.29, p.3017–3024, 2010.

LANZA, A.M.; KIM, D.S.; ALPER, H.S. Evaluating the influence of selection markers on obtaining selected pools and stable cell lines in human cells. **Biotechnol. J.** v.8, p.811-821, 2013.

LI, Y.; RANKIN, S.A.; SINNER, D.; KENNY, A.P.; KIEG, P.A.; ZORN, A.M. Sfrp5 coordinates foregut specification and morphogenesis by antagonizing both canonical and noncanonical Wnt11 signaling. **Genes Dev** v. 22, p. 3050-3063, 2008b.

LIEBNER, S.; PLATE, K.H. Differentiation of the brain vasculature: the answer came blowing by the Wnt. **J Angiogenesis Res.** v.2, p.1. doi: 10.1186/2040-2384-2-1, 2010.

MAO, B.; NIEHRS, C. Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/IRP6 signaling. **Gene** v.302, p.179-183, 2003.

MARTIN, D.I.; WHITELAW, E. The vagaries of variegating transgenes. **Bioessays**, v.18(11), p.919-23, 1996.

LIN, Y.W.; CHUNG, M.T.; LAI, H.C.; DE YAN, M.; SHIH, Y.L.; CHANG, C.C.; YU, M.H. Methylation analysis of SFRP genes family in cervical adenocarcinoma. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** v. 135, p.1665–1674, 2009.

LUO, X.; WEI, B.; CHEN, A.; ZHAO, H.; HUANG, K.; CHEN, J. Methylation-mediated loss of SFRP2 enhances melanoma cell invasion via Wnt signaling. **Am J Transl Res** v. 8(3), p. 1502-1509, 2016.

MOSKALEV, E.A.; LUCKERT, K.; VOROBEV, I.A.; MASTITSKY, S.E.; GLADKIKH, A.A.; STEPHAN, A.; SCHRENK, M.; KAPLANOV, K.D.;

KALASHNIKOVA, O.B.; POTZ, O. *et al.* Concurrent epigenetic silencing of Wnt/beta-catenin pathway inhibitor genes in B cell chronic lymphocytic leukaemia. **BMC Cancer** v.12, p.213, 2012.

NG, O.H.; ERBILGIN, Y.; FIRTINA, S.; CELKAN, T.; KARAKAS, Z.; AYDOGAN, G.; TURKKAN, E.; YILDIMAK, Y.; TIMUR, C.; ZENGİN, E.; *et al.* Deregulated WNT signaling in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Blood Cancer J** v. 4: e192, 2014.

NGUYEN, L.V.; VANNER, R.; DIRKS, P.; EAVES, C.J. Cancer stem cells: an evolving concept. **Nat Rev Cancer** v. 12, p.133-143. 2012.

NIEHRS, C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, v. 13(12), p. 767-79, 2012.

NIEHRS, C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. **Oncogene** v. 25, p. 7469-7481, 2006.

NUSSE, R. Wnt Signaling. **Cold Spring. Harb Perspect Biol** 4:a011163, 2012.

PALUSZCZAK, J.; SARBAK, J.; KOSTRZEWSKA-POCZEKAJ, M.; KIWERSKA, K.; JAEMUZ-SZYMCAK, M.; GRENMAN, R.; MIELCAREK-KUCHTA, D.; BAER-DUBOWSKA, W. The negative regulators of Wnt pathway-DACH1, DKK1, and WIF1 are methylated in oral and oropharyngeal cancer and WIF1 methylation predicts shorter survival. **Tumor Biol** p.2855–2861, 2015.

PERRY, A.S.; O'HURLEY, G.; RAHEEM, O.A.; BENNAN, K.; WONG, S.; O'GRADY, A.; KENNEDY, A.M.; MARIGNOL, L.; MURPHY, T.M.; SULLIVAN, L.; BARRETT, C.; LOFTUS, B.; THORNHILL, J.; HEWITT, S.M.; LAWLER, M.; KAY, E.; LYNCH, T.; HOLLYWOOD, D. Gene expression and epigenetic discovery screen reveal methylation of SFRP2 in prostate cancer. **Int J Cancer** v. 132(8), p. 1771-80, 2013.

RECILLAS-TARGA, F. Gene Transfer and Expression in Mammalian Cell Lines and Transgenic Animals. **Methods Mol Biol** v.267, p.417-33, 2004.

REHN, M.; PIHLAJANIEMI, T.; HOFMANN, K.; BUCHER, P. The frizzled motif: in how many different protein families does it occur? **Trends Biochem Sci.** v. 23, p.415-417, 1998.

ROMAN-GOMEZ, J.; JIMENEZ-VELASCO, A.; AGIRRE, X.; CASTILLEJO, J.; NAVARRO, G.; BARRIOS, M.; ANDREU, E.J.; PROSPER, F.; HEINIGER, A.; TORRES, A. Transcriptional silencing of the Dickkopfs-3 (Dkk-3) gene by CpG hypermethylation in acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Cancer** v.91, p.707–713, 2004.

RUBIN, J.S.; BARSHISHAT-KUPPER, M.; FEROZE-MERZOUG, F.; XI, Z.F. Secreted WNT antagonists as tumor suppressors: pro and con. **Front Biosci** v. 11, p. 2093-105, 2006.

SAMAEI, N.M.; YAZDANI, Y.; ALIZADEH-NAVAEI, R.; AZADEH, H.; FARAZMANDFAR, T. Promoter methylation analysis of WNT/ β -catenin pathway regulators and its association with expression of DNMT1 enzyme in colorectal cancer. **J Biomed Sci** v.21, p.73, 2014.

SANCHEZ-TILLO, E.; BARRIOS, O. De.; SILES, L.; CUATRECASAS, M.; CASTELLS, A.; POSTIGO, A. β -catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness. **PNAS** v.108, p.19204–19209, 2011.

SANTOS, N.F.B. Desenvolvimento de novos vetores para expressão de anticorpos e proteínas oligoméricas. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Laboratório de Proteômica e Engenharia de Proteínas, Instituto Carlos Chagas – ICC/FIOCRUZ-PR, 2016.

SATOH, W.; MATSUYAMA, M.; TAKEMURA, H.; AIZAWA, S.; SHIMONO, A. Sfrp1, Sfrp2, and Sfrp5 regulate the Wnt/ β -catenin and the planar cell polarity pathways during early trunk formation in mouse. **Genesis** v. 46, p. 92-103. 2008.

SCHRÖDER, M.; KAUFMAN, R.J. ER stress and the unfolded protein response. **Mutation Research** v.569(1-2), p.29-63, 2005.

SUGIYAMA, Y.; STUMP, R.J.; NGUYEN, A.; WEN, L.; CHEN, Y.; WANG, Y.; MURDOCH, J.N.; LOVICU, F.J.; McAVOY, J.W. Secreted frizzled-related protein disrupts PCP in eye lens fiber cells that have polarised primary cilia. **Dev Biol** v. 338, p. 193–201, 2010.

SURANA, R.; SIKKA, S.; CAI, W.; SHIN, E.M.; WARRIER, S.R.; TAN, H.J.G.; ARFUSO, F.; FOX, S.A.; DHARMARAJAN, A.M.; KUMAR, A.P. Secreted frizzled related proteins: Implications in cancers. **Biochim Biophys Acta - Rev Cancer** v.1845, p.53–65, 2013.

THOMAS, P.; SMART, T.G. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. **J Pharmacol Toxicol Methods** v. 51(3), p. 187-200, 2005.

URAKAMI, S.; SHIINA, H.; ENOKIDA, H.; KAWAKAMI, T.; KAWAMOTO, K.; HIRATA, H.; TANAKA, Y.; KIKUNO, N.; NAKAGAWA, M.; IGAWA, M.; DAHIYA, R. Combination Analysis of Hypermethylated Wnt-Antagonist Family Genes as

a Novel Epigenetic Biomarker Panel for Bladder Cancer Detection. **Clinical Cancer Research** v. 12(7), 2006.

UREN, A.; REICHSMAN, F.; ANEST, V.; TAYLOR, W.G.; MURAISSO, K.; BOTTARO, D.P.; CUMBERLEDGE, S.; RUBIN, J.S. Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling. **J Biol Chem** v. 275, p. 4374-4382, 2000.

VALENCIA, A.; ROMAN-GOMEZ, J.; CERVERA, J.; SUCH, E.; BARRAGAN, E.; BOLUFER, P.; MOSCARDO, F.; SANZ, G.F.; SANZ, M.A. Wnt signaling pathway is epigenetically regulated by methylation of Wnt antagonists in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 9, p. 1658-66, 2009.

VEECK, J.; DAHL, E. Targeting the Wnt pathway in cancer: The emerging role of Dickkopf-3. **Biochim Biophys Acta - Rev Cancer** v.1825, p.18–28, 2012.

VEECK, J.; NOETZEL, E.; BEKTAS, N.; JOST, E.; HARTMANN, A.; KNÜCHEL, R.; DAHL, E. Promoter hypermethylation of the SFRP2 gene is a high-frequent alteration and tumor-specific epigenetic marker in human breast cancer. **Mol Cancer** v. 7(83), 2008.

VERMEULEN, L.; DE SOUSA E MELO, F.; VAN DER HEIJDEN, M.; CAMERON, K.; DE JONG, J.H.; BOROVSKI, T.; TUYNMAN, J.B.; TODARO, M.; MERZ, C.; RODERMOND, H.; SPRICK, M.R.; KEMPER, K.; RICHEL, D.J.; STASSI, G.; MEDEMA, J.P. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. **Nat Cell Biol** v. 12(5), p. 468-76, 2010.

VINCENT, A.; OMURA, N.; HONG, S-M.; JAFFE, A.; ESHLEMAN, J.; GOGGINS, M. Genome-wide analysis of promoter methylation associated with gene expression profile in pancreatic adenocarcinoma. **Clin Cancer Res** v.17, p.4341–4354, 2011.

WANG, H.; FAN, R.; WANG, X.Q.; WU, D.P.; LIN, G.W.; XU, Y.; LI, W.Y. Methylation of Wnt antagonist genes: A useful prognostic marker for myelodysplastic syndrome. **Ann Hematol** v.92, p.199–209, 2013.

WHITE, B.D.; CHIEN, A.J.; DAWSON, D.W. Dysregulation of Wnt/ β -catenin Signaling in Gastrointestinal Cancers. **Gastroenterology** v. 142(2), p. 219-232, 2012.

WHITELAW, E.; SUTHERLAND, H.; KEARNS, M.; MORGAN, H.; WEAVING, L.; GARRICK, D. Epigenetic Effects on Transgene Expression. **Methods Mol Biol** v.158, p. 351-68, 2001.

WILLERT, K.; NUSSE, R. Wnt proteins. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 4: a007864. 2012.

WOLF, V.; ENDO, Y.; RUBIN, J.S. Purification and Wnt-inhibitory activities of secreted frizzled-related proteins. **Methods Mol Biol** v. 468, p. 31-44, 2008.

WONG, T.K.; NEUMANN, E. Electric field mediated gene transfer. **Biochem Biophys Res Commun** v. 107(2), p. 584-7, 1982.

XIANG, T.; LI, L.; YIN, X.; ZHONG, L.; PENG, W.; QIU, Z.; REN, G.; TAO, Q. Epigenetic silencing of the WNT antagonist Dickkopf 3 disrupts normal Wnt/ β -catenin signalling and apoptosis regulation in breast cancer cells. **J Cell Mol Med** v.17, p.1236–1246, 2013.

XIAO, C.; WANG, L.; ZHU, L.; ZHANG, C.; ZHOU, J. Secreted frizzled related protein 2 is epigenetically silenced and functions as a tumor suppressor in oral squamous cell carcinoma. **Mol Med Rep** v.10, p.2293–2298, 2014.

XIAO, X.; XIAO, Y.; WEN, R.; ZHANG, Y.; LI, X.; WANG, H.; HUANG, J.; LIU, J.; LONG, T.; TANG, J. Promoting roles of the secreted frizzled-related protein 2 as a Wnt agonist in lung cancer cells. **Oncol Rep** v.34, p.2259–2266, 2015.

YAMAMURA, S.; KAWAKAMI, K.; HIRATA, H.; UENO, K.; SAINI, S.; MAJID, S.; DAHIYA, R. Oncogenic functions of secreted Frizzled-related protein 2 in human renal cancer. **Mol Cancer Ther** v.9, p.1680–1687, 2010.

YEUNG, J.; ESPOSITO, M.T.; GANDILLET, A.; ZEISIG, B.B.; GIESSINGER, E.; BONNET, D.; SO, C.W.E. β -Catenin Mediates the Establishment and Drug Resistance of MLL Leukemic Stem Cells. **Cancer Cell** v. 18, p. 606–618, 2010.

ZENG, X.; HUANG, H.; TAMAI, K.; ZHANG, X.; HARADA, Y.; YOKOTA, C.; ALMEIDA, K.; WANG, J.; DOBLE, B.; WOODGETT, J.; WYNshaw-BORIS, A.; HSIEH, J.C.; HE, X. Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. **Development**. v.135, p.367–375, 2008.

ZHONG, X.; DESILVA, T.; LIN, L.; BODINE, P.; BHAT, R.A.; PRESMAN, E.; POCAS, J.; STAHL, M.; KRIZ, R. Regulation of Secreted Frizzled-related Protein-1 by Heparin. **The Journal of Biological Chemistry**. v.282(28), p.20523-20533, 2007.

ZIMMERMAN, Z.F.; MOON, R.T.; CHIEN, A.J. Targeting Wnt Pathways in Disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol** v. 4(11), a008086, 2012.

ZURAWEL, R.H.; CHIAPPA, S.A.; ALLEN, C.; RAFFLE, C. Sporadic medulloblastomas contain oncogenic β -catenin mutations. **Cancer Res** v. 58, p. 896–899, 1998.